

Aus dem Med. Zentrum für Kinderheilkunde der Philipps-Universität Marburg

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. R. F. Maier

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,  
Standort Marburg

**Validierung von Microarray-Genexpressionsdaten bei Neuroblastomen  
mittels quantitativer Real-Time PCR**

**Inaugural-Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
(Dr. med.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Ali Kartal**

aus Siegen

Marburg 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 28.11.2007.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. H. Christiansen

Korreferent: Prof. Dr. R. Müller

In großer Dankbarkeit  
meinen Eltern  
Battal und Nazmiye Kartal  
gewidmet

# **Inhaltsverzeichnis**

|   | <b>Seite</b> |
|---|--------------|
| <b>1. Einleitung</b>  | <b>1</b>     |
| <b>1.1 Das Neuroblastom</b>   | <b>1</b>     |
| 1.1.1 Definition und Allgemeines  | 1            |
| 1.1.2 Inzidenz  | 1            |
| 1.1.3 Histologie  | 2            |
| 1.1.4 Klinik  | 3            |
| 1.1.5 Stadieneinteilung nach INSS   | 4            |
| 1.1.6 Therapie  | 5            |
| 1.1.7 Prognose  | 6            |
| 1.1.8 Tumorgenetik  | 7            |
| 1.1.8.1 DNA-Gehalt der Tumor-Zellen   | 8            |
| 1.1.8.2 Klinische und molekulargenetische prognostische Marker                  | 8            |
| <b>1.2 MYCN</b>   | <b>10</b>    |
| <b>1.3 cDNA-Microarray</b>  | <b>14</b>    |
| <b>1.4 PCR als Validierungsmethode für Microarray-Experimente</b>               | <b>15</b>    |
| <br>  |              |
| <b>2. Fragestellung</b>   | <b>17</b>    |
| <br>  |              |
| <b>3. Material und Methoden</b>   | <b>18</b>    |
| <b>3.1 Tumormaterial</b>  | <b>18</b>    |
| <b>3.2 Isolierungen genomischer DNA aus kultivierten Neuroblastomzelllinien</b> | <b>20</b>    |
| <b>3.3 Isolierungen genomischer DNA aus Neuroblastomtumorproben</b>             | <b>21</b>    |
| <b>3.4 RNA-Isolierungen aus Neuroblastomtumorproben</b>                         | <b>22</b>    |
| <b>3.5 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)</b>                                | <b>24</b>    |
| <b>3.6 PCR (Polymerasekettenreaktion)</b>                                       | <b>25</b>    |
| 3.6.1 Quantitative Real-Time PCR  | 27           |
| 3.6.2 SYBR Green PCR  | 27           |
| 3.6.3 Taqman PCR  | 29           |

|   |               |
|---|---------------|
| <b>3.7 Amplikon (Zielsequenz) Design</b>  | <b>32</b>     |
| <b>3.8 Primer Design</b>  | <b>32</b>     |
| <b>3.9 Gelelektrophorese der PCR-Produkte und Färbung</b>   | <b>34</b>     |
| <b>3.10 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Färbung</b>   | <b>35</b>     |
| <b>3.11 Statistische Verfahren</b>  | <b>36</b>     |
| <br><b>4. Ergebnisse</b>  | <br><b>37</b> |
| <b>4.1 Validierung der Microarray-Genexpressionsdaten mittels SYBR Green PCR</b>                    | <b>37</b>     |
| 4.1.1 Standardisierung der cDNA-Konzentrationen mit Hilfe der Real-Time $\beta$ -actin PCR          | 38            |
| 4.1.2 Validierung der MYCN Genexpressionsdaten  | 40            |
| 4.1.3 Validierung der Aurora-A Genexpressionsdaten  | 43            |
| 4.1.4 Validierung der TRAP1 Genexpressionsdaten   | 46            |
| 4.1.5 Validierung der EFNB3 Genexpressionsdaten   | 49            |
| 4.1.6 Validierung der SOCS-1 Genexpressionsdaten  | 52            |
| <b>4.2 Analyse der differentiell exprimierten Gene in einem MYCN induzierbaren Zellkultursystem</b> | <b>55</b>     |
| <b>4.3 Untersuchungen von Aurora-A Amplifikationen mit dem Taqman Verfahren</b>                     | <b>57</b>     |
| <br><b>5. Diskussion</b>  | <br><b>61</b> |
| <b>5.1 Northern-Blot</b>  | <b>62</b>     |
| <b>5.2 Ribonuklease Protektion Assay</b>  | <b>62</b>     |
| <b>5.3 In Situ Hybridisierung (ISH)</b>   | <b>63</b>     |
| <b>5.4 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qrt-PCR)</b>                                | <b>63</b>     |
| 5.4.1 Probleme der Real-Time PCR  | 64            |
| 5.4.2 Standardisierung der quantitativen Real-Time PCR  | 65            |
| 5.4.3 Einsatz der Real-Time PCR zur Validierung der Microarray-Genexpressionsdaten                  | 66            |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>5.5 Eigene Ergebnisse</b>  | <b>67</b> |
| 5.5.1 Validierung der Microarray-Genexpressionsdaten<br>mittels SYBR Green PCR          | 67        |
| 5.5.2 Analyse der differentiell exprimierten Gene in einem<br>MYCN induzierbaren System | 71        |
| 5.5.3 Untersuchungen von Aurora-A Amplifikationen mit<br>dem Taqman Verfahren           | 73        |
| <b>6. Zusammenfassung</b>   | <b>75</b> |
| <b>7. Literaturverzeichnis</b>  | <b>77</b> |
| <b>8. Anhang</b>  | <b>96</b> |
| <b>8.1 Abkürzungen</b>  | <b>96</b> |
| <b>8.2 Akademische Lehrer</b>   | <b>98</b> |
| <b>8.3 Danksagung</b>   | <b>99</b> |

## **Einleitung**

### **1.1 Das Neuroblastom**

#### **1.1.1 Definition und Allgemeines**

Das Neuroblastom ist histologisch definiert. Es ist ein frühkindlicher, embryonaler Tumor, dessen Zellen ihren Ursprung von chromaffinen Zellen des sympathischen Grenzstranges nehmen. Entsprechend ist der Primärtumor entlang der Wirbelsäule im Bereich des Grenzstranges oder der Nebenniere lokalisiert. Sowohl die klinische Ausprägung als auch die Lokalisation des Primärtumors sind sehr variabel. Es gibt hauptsächlich zwei Typen von Neuroblastomtumoren. Die einen wachsen vorwiegend lokalisiert, zeigen spontane Regression und haben eine günstige Prognose. Die anderen sind bei Diagnosestellung metastasiert, zeigen ein aggressives Wachstum und haben eine schlechte Prognose. Sowohl histologisch als auch biochemisch sind diese beiden Neuroblastom-Typen nicht voneinander zu unterscheiden. In der Mehrzahl der Fälle sind die Metastasen in Lymphknoten, Knochenmark, Leber und subkutanem Gewebe lokalisiert. Das Patientenalter und das Tumorstadium zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sind wesentliche, die Tumorprognose beeinflussende Faktoren.

#### **1.1.2 Inzidenz**

Das Neuroblastom ist der häufigste solide und maligne extrakranielle Tumor des Kindesalters mit einer Inzidenz von 1,1 Erkrankungen auf 100.000 Kinder unter 15 Jahren. In Deutschland sind 7,3 % aller malignen Erkrankungen im Kindesalter Neuroblastome (NB-97 Studie). Etwa 10-15 % aller durch Krebserkrankungen bedingten Todesfälle gehen auf das Neuroblastom zurück. Circa 90 % aller Neuroblastomdiagnosen werden in den ersten 5 Lebensjahren gestellt, wobei das mittlere Alter bei Diagnosestellung bei etwa 22 Monaten liegt (NB-97 Studie). In Deutschland ist mit circa 130 Neuerkrankungen pro Jahr zu rechnen. Das

Geschlechterverhältnis ist mit 1,1:1 für Jungen:Mädchen annähernd gleich. Studien haben gezeigt, dass die Altersinzidenz einen biphasischen Verlauf mit einer Spitze vor dem ersten Lebensjahr und einer zweiten Spitze zwischen dem zweiten und vierten Lebensjahr aufweist (Kaatsch et al., 1999).

Die in Autopsiestudien und in Screeningprogrammen beobachtete erhöhte Neuroblastominzidenz lässt vermuten, dass eine nicht unerhebliche Anzahl von Erkrankungen im Säuglingsalter unentdeckt regredieren (Schilling et al., 2003).

### **1.1.3 Histologie**

Das Neuroblastom nimmt nach heutigem Kenntnisstand seinen Ausgang von den primitiven, pluripotenten Zellen des sympathischen Systems.

Es wird histopathologisch zu den „klein-, blau- und rundzelligen Tumoren“ des Kindesalters gezählt und ist durch neuroblastische Zellen charakterisiert. Weitere dieser Gruppe angehörige Tumore sind das Ewing-Sarkom, das Non-Hodgkin-Lymphom, die Primitiv-Neuroektodermalen Tumore und das Rhabdomyosarkom.

Nach histopathologischen Kriterien werden drei Subtypen unterschieden: das Ganglioneuroblastom, das Ganglioneurom und das eigentliche Neuroblastom. Das typische Neuroblastom besteht aus einem homogenen Zellbild mit kleinen, runden, zytoplasmaarmen und hyperchromaffinen Zellen. In 15-50 % der Fälle sind die Neuroblasten als so genannte „Homer-Wright-Pseudorosetten“ angeordnet (Slavc et al., 1990). Das Neuroblastom kann unter Zuhilfenahme der Lichtmikroskopie und Hämatoxylin-Eosin Färbung von Tumoren mit ähnlichem Zellbild unterschieden werden.

Das Ganglioneurom ist gutartig und besteht aus ausdifferenzierten Ganglienzellen mit einem Schwann-Zellstroma.

Charakteristisch für das Ganglioneuroblastom ist, dass neben unreifen Neuroblasten auch reife Ganglienzellen und Schwann-Zellen vorkommen. Das Ganglioneuroblastom kann fokal oder diffus lokalisiert sein, wobei die diffuse Form weniger aggressiv ist.



Eine Einteilung der Neuroblastome in prognostisch unterschiedliche Tumorgruppen erfolgte nach histopathologischen Kriterien durch Shimada und Joshi (Shimada et al., 1984; Joshi et al., 1992) (siehe Tab.1.1).

Tab 1.1: Einteilung der Neuroblastome nach histopathologischen Kriterien

|                | <b>Prognostisch günstig</b>  | <b>Prognostisch ungünstig</b>  |
|----------------|--|--|
| <b>Shimada</b> | -Schwann-Zell-Stromareich<br>-hoher Differenzierungsgrad<br>-MKI < 100<br>-Alter < 18 Monate       | -Schwann-Zell-Stromaarm<br>-niedriger Differenzierungsgrad<br>-MKI > 100<br>-Alter > 18 Monate |
| <b>Joshi</b>   | -Kalzifikation vorhanden<br>-wenige Mitosen<br>-Grad 1, alle Altersklassen<br>-Grad 2, < 12 Monate | -keine Kalzifikation<br>-viele Mitosen<br>-Grad 2, >1a<br>-Grad 3, alle Altersklassen          |

**MKI:** Mitose-Kariorrhexis-Index (Anzahl von Mitosen und Zellkernrzerfällen pro 5000 Zellen)

#### 1.1.4 Klinik

Das klinische Beschwerdebild ist vom Sitz des Primärtumors abhängig. In 65 % der Fälle ist der Primärtumor im Abdomen lokalisiert. Bei der körperlichen Untersuchung fallen die abdominellen Tumore als derbe, nicht verschiebliche, harte Raumforderung auf. Durch die Verdrängung von abdominellen Organen kann es zu gastrointestinalen Beschwerden, wie Völlegefühl, Erbrechen, uncharakteristischen Schmerzen und Anorexie kommen. Ein Hypertonus wird in den meisten Fällen durch die Kompression von renalen Gefäßen verursacht (Kedar et al., 1981). Die Produktion von relativ unwirksamen Katecholaminmetaboliten führt in seltenen Fällen zu arterieller Hypertonie, Tachykardie sowie zu Schwitz- und Flush-Symptomatik.

Bei Lokalisation des Tumors im oberen Thorax, beziehungsweise im Bereich der cervicalen Wirbelsäule, kann eine einseitige Ptosis, Myosis und eine fehlende Schweißsekretion auftreten (Horner-Syndrom).

Bei paravertebralem Sitz kann es durch die Einengung von Spinalnervenzwurzeln in den Foramina intervertebralia zu Blasen- und Darmfunktionsstörungen kommen. Ferner können Schmerzen und Parästhesien ausgelöst werden. Schwere und langandauernde Durchfälle, die mit Hypokaliämie und Dehydratation (Kerner-Morrison) vergesellschaftet sind, werden durch die Produktion des vasoaktiven intestinalen Peptids verursacht (El Shafie et al., 1983).

Die Metastasierung beim Neuroblastom erfolgt entweder über den Blutkreislauf oder über das Lymphsystem. Bei der hämatogenen Metastasierung werden in den meisten Fällen das Knochenmark, die Knochen, die Leber und die Haut befallen. Kutane Metastasen kommen ausschließlich im Stadium IVS nach Evans vor, die als schmerzfreie, bläuliche, subkutane Knoten imponieren (Evans et al., 1971).

### 1.1.5 Stadieneinteilung nach INSS ( International-Neuroblastoma-Staging-System)

Die Stadieneinteilung hinsichtlich der Tumorausbreitung erfolgte anfänglich nach Evans et al. und umfasste die Stadien I-IV, sowie IVS (Evans et al., 1971). Die Evans-Klassifikation wurde durch die Einführung der INSS-Klassifikation zur heute gültigen Fassung erweitert (siehe Tab. 1. 2).

Ein Sonderfall in der Einteilung sind Neuroblastome im Stadium 4S, die nur im Säuglingsalter beobachtet werden und eine Spontanregression ohne jegliche Therapie zeigen können.

Gleichzeitig wird bei Neuroblastomen desselben Stadiums mit MYCN Amplifikation beobachtet, dass sie in das prognostisch ungünstigere Stadium 4 übergehen können.

Tab 1.2:

| Internationale Stadieneinteilung des Neuroblastoms nach INSS<br>( aus der NB-97 Studie) |   |
|---|---|
| Stadium 1   | Lokalisierter Tumor mit makroskopisch kompletter Entfernung (mit oder ohne mikroskopischem Resttumor); repräsentative ipsi- und kontralaterale Lymphknoten sind histologisch ohne Tumorbefall. Lediglich unmittelbar am Tumor adhärente, chirurgisch entfernte Lymphknoten dürfen positiv sein.<br><br>Auch bilaterale Tumoren, die makroskopisch komplett extirpiert werden können und keinen regionalen Lymphknotenbefall aufweisen, gehören zum Stadium 1. |
| Stadium 2   | a)Unilateraler Tumor mit makroskopisch inkompletter Entfernung; repräsentative ipsi- oder kontralaterale Lymphknoten sind histologisch ohne Tumorbefall.<br>b)Unilateraler Tumor; regionale, ipsilaterale, nichtadhärente Lymphknoten zeigen Tumorbefall, kontralaterale Lymphknoten sind histologisch negativ.   |

|            |  |
|------------|--|
| Stadium 3  | Nichtresektabler unilateraler Tumor mit Überschreiten der Mittellinie mit oder ohne Lymphknotenbefall oder unilateraler lokalisierter Tumor mit kontralateralem Lymphknotenbefall oder nichtresektabler Mittellinientumor mit bilateraler Ausdehnung durch Infiltration oder durch Lymphknotenbefall (bis zur oder über die jeweilige Wirbelkante hinaus). |
| Stadium 4  | Disseminierung des Tumors zu Knochenmark, Knochen, entfernten Lymphknoten, Leber, Haut und/oder anderen Organen.   |
| Stadium 4S | Lokalisierter Primärtumor wie beim Stadium 1, 2a oder 2b und Disseminierung nur in Leber, Haut und/oder Knochenmark.<br><br>Nur Säuglinge im 1. Lebensjahr. Die Knochenmarkinfiltration ist gering (weniger als 10 % Tumorzellen im Ausstrich, mIBG für Knochenmark negativ). Übergang in das Stadium 4 möglich.   |

### 1.1.6 Therapie

Die Gesamtpopulation der Neuroblastompatienten wird in Risikogruppen eingeteilt und nach entsprechenden Therapieprotokollen behandelt (NB-97 Studie).

Nach einer initialen Operation/Biopsie zur histologischen Diagnosesicherung werden Säuglinge der Stadien 1-3, sowie 4S bei gleichzeitigem Ausschluss einer MYCN Amplifikation für 6-12 Monate ausschließlich beobachtet.

Eine Behandlung nach dem Standardrisiko-Protokoll erfolgt, wenn die erwartete Tumorregression ausbleibt oder eine Tumorprogression eintritt.

Säuglinge der Stadien 2-3 mit tumorinduzierten Symptomen bei gleichzeitigem Ausschluss einer MYCN Amplifikation werden in die Standardrisikogruppe eingeteilt.

Patienten der Standardrisikogruppe erhalten nach Erstoperation/Biopsie eine 4 Monate dauernde Chemotherapie, anschließend eine Zweitoperation, bei der eine radikale Tumorentfernung angestrebt wird. Bei ungenügendem Operationserfolg wird das Resttumorgewebe bestrahlt und ggf. werden weitere Chemotherapieblöcke durchgeführt.

Patienten mit Stadium 4 Neuroblastom und alle Patienten mit MYCN Amplifikation werden nach dem Hochrisiko-Protokoll behandelt. Auch hier ist der erste Behandlungsschritt die biopsische Diagnosesicherung und Materialgewinnung für die Molekularbiologie.

Die Hochdosischemotherapie besteht aus 4-6 jeweils einen Monat dauernden Blöcken und einer anschließenden Zweitoperation, mit dem Ziel der radikalen Entfernung von Resttumorgewebe.

Nach dem entsprechenden Therapieprotokoll werden die Patienten für die weitere Therapie studienbedingt randomisiert in zwei Gruppen eingeteilt. Die eine Gruppe erhält eine knochenmarkablative, die so genannte Megatherapie mit anschließender autologer Stammzellreimplantation, die andere eine Erhaltungskemotherapie.

Ein Sonderfall in der Therapie stellt das Stadium 4S dar. Durch reduzierte Chemotherapie kann eine Tumorrückbildung induziert werden, falls keine spontane Tumorregression eintritt.

#### **1.1.7 Prognose**

Die Analyse der 10-Jahres Überlebensrate von 2151 nicht selektierten Neuroblastompatienten der deutschen Neuroblastomstudie betrug 61% (Berthold und Hero, 2000). Die Prognose für die Einzelstadien, beruhend auf den Daten der Neuroblastomstudie von 1997, basiert auf 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeiten. Sie liegt bei 99 % für das Stadium 1 und bei 93 % für das Stadium 2. Für das Stadium 3 beträgt sie 80 % und sinkt im Stadium 4 drastisch auf 31 % ab. Die Überlebenswahrscheinlichkeit im Stadium 4S beträgt trotz eines anfangs ausgedehnten Primärtumors 77 %. Folglich stellen sich zwei Prognosegruppen mit unterschiedlichen Überlebenswahrscheinlichkeiten heraus. Demnach gehören Kinder mit lokalisiertem Tumorbefall (Stadium 1-3 und 4S) zur günstigen Prognosegruppe. Während die ungünstige Prognosegruppe Stadium 4 Neuroblastome beinhaltet. Für Säuglinge beträgt die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit 85 % gegenüber 42 % für Kinder älter als ein Jahr, wie in einer Untersuchung an 615 Studienteilnehmern gezeigt werden konnte. Demnach sind die Überlebenswahrscheinlichkeiten für alle Tumorstadien im Säuglingsalter besser als nach dem 1. Lebensjahr.

Durch Optimierung der Therapieschemata verbesserte sich die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit aller Neuroblastom-Patienten kontinuierlich von der Neuroblastomstudie 1990 bis zur Neuroblastomstudie 1997 von 46 % auf 58 %.

In etwa 25 % aller primären Neuroblastomen liegt eine Amplifikation des MYCN-Gens auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 vor. Die Amplifikation ist mit höheren INSS-Stadien (3 u. 4), schneller Tumorprogression und einer insgesamt schlechteren Prognose vergesellschaftet (Brodeur et al., 1984; Seeger et al., 1985).

### **1.1.8 Tumorgenetik**

Deletion des kurzen Armes eines Chromosoms 1 ( LOH ( loss of heterozygosity)), das Auftreten von extrachromosomalen DNA-Abschnitten, so genannten „double-minute-bodies“ (dmns) und homogen anfärbbaren Regionen ( HSR ( homogeneously staining regions)) sind charakteristische Ereignisse in Neuroblastomen (Brodeur et al., 1977). In 70 bis 80 % aller primären Neuroblastomen mit diploidem Chromosomensatz kann ein Verlust genetischen Materials im Bereich des kurzen Armes von Chromosom 1 beobachtet werden, welches mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Gilbert et al., 1982; Brodeur et al., 1989).

Die Konsensus-Verlustregion befindet sich im Bereich der Subbanden 1p36 (Weith et al., 1989). Im Bereich dieser Verlustregion werden ein oder mehrere potentielle Tumorsuppressorgene vermutet, die für die maligne Transformation und Tumorprogression verantwortlich gemacht werden (Takeda et al., 1994; Caron et al., 1995).

In nahezu 25 % aller primären Neuroblastomen werden dmns beobachtet. Das Vorkommen von dmns und HSR sind genetischen Veränderungen, die auf eine Genamplifikation hinweisen (Brodeur et al., 1986).

Weitere LOHs wurden für die Chromosomenabschnitte 1p, 3p, 4p, 9p, 11q, 14q und 17p beschrieben und zum Teil mit Tumorentstehung und Tumorprogression in Verbindung gebracht (Gilbert et al., 1984).

In einer Untersuchungsgruppe mit 394 Tumoren, wurde in bis zu 41 % aller untersuchten Neuroblastomproben eine Deletion des langen Armes von Chromosom 11 im Bereich der Konsensusregion 11q23 beobachtet. Dies geht bei MYCN nicht amplifizierten Patienten mit einer reduzierten Überlebenswahrscheinlichkeit einher.

Die Deletion in der Konsensus-Verlustregion 11q23 korreliert einerseits signifikant mit dem Stadium 4 nach dem INSS und mit der prognostisch ungünstigen histopathologischen Einteilung des Neuroblastoms nach Shiamda, sowie andererseits invers mit der Amplifikation des MYCN -Gens (Guo et al., 2000).

Fong et al. konnten zeigen, dass die Deletion des langen Armes von Chromosom 14 häufig in Neuroblastomen vorkommt. Sie korreliert signifikant mit der Konsensus-Verlustregion des Chromosoms 11q und invers mit der MYCN Amplifikation (Fong et al., 1992).

Zugewinne genetischen Materials wurden auf dem langen Arm des Chromosoms 17 (17q21) beobachtet und sind mit einer schlechteren Langzeitprognose vergesellschaftet. Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 168 Patienten mit partiellem Zugewinn genetischen Materials im Bereich von 17q betrug 30,6 % gegenüber 86,0 % bei 145 Patienten ohne dieses genetische Merkmal; somit kommt diesem genetischen Marker eine besondere prognostische Bedeutung zu (Bown et al., 1999).

#### **1.1.8.1 DNA-Gehalt der Tumor-Zellen**

Durch die flowzytometrische Messung lassen sich Neuroblastome in zwei Gruppen unterteilen. Tumoren der ersten Gruppe, die einen diploiden Chromosomensatz besitzen (so genannter DNA-Index (DI) =1), sind mit fortgeschrittenen Stadien, einer ungünstigen Prognose und einem schlechten Zytostatika-Therapieerfolg assoziiert. Tumoren der zweiten Gruppe mit hyperploidem DNA-Gehalt (DI>1) hingegen sind mit niedrigen Tumorstadien, einer günstigeren Langzeitprognose und mit gutem Zytostatika-Therapieerfolg vergesellschaftet.

Look et al. untersuchten ein Kollektiv von 298 Neuroblastompatienten. In 25 % der Fälle wurde MYCN Amplifikation nachgewiesen, mit signifikanter Häufung in Tumoren mit diploidem DNA-Satz.

Die Hyperloidie kann nur bis zum zweiten Lebensjahr als prognostisch günstiger Faktor gewertet werden, da sich strukturelle Veränderungen, wie Deletion in höheren Lebensjahren anhäufen (Look et al., 1984; Look et al., 1991).

#### **1.1.8.2 Klinische und molekulargenetische prognostische Marker**

Eine Vielzahl von prognostischen Veränderungen ist beim Neuroblastom bekannt und korreliert mit einer günstigen oder ungünstigen Prognose.

Der Quotient der Katecholamin-Abbauprodukte Homovanillinsäure (HVA) und Vanillinmandelsäure (VMA) ist von prognostischer Bedeutung für das Neuroblastom.

Ein geringerer Quotient (HVA/VMA) ist oft mit einer günstigen Prognose assoziiert (Evans, 1980). Die 60-Monate-Überlebensrate bei Patienten mit einem HVA/VMA Quotient zwischen 1 und 2 beträgt 80 %, während die Überlebenswahrscheinlichkeit bei Patienten mit Quotienten  $<1$  beziehungsweise  $>2$  sich drastisch auf Werte von 24,1 % beziehungsweise 5,3 % reduziert (Nishi et al., 1998).

Als weiterer Marker kann die neuronenspezifische Enolase (NSE) herangezogen werden. Höhere Blutspiegel sind mit einer signifikant schlechteren Prognose verbunden (Zeltzer et al., 1987).

Erhöhte LDH (Laktat-Dehydrogenase) und Serum-Ferritinwerte bei Diagnosestellung gehen gleichermaßen mit einer schlechteren Prognose einher (Evans et al., 1971; Shuster et al., 1992). Neben den klinischen existieren zahlreiche molekulargenetische prognostische Marker.

Innerhalb der letzten 30 Jahre wurde eine Vielzahl molekularer Marker entdeckt, die im Neuroblastom prognostische Relevanz haben. Nachfolgend wird eine Auswahl verschiedener Marker vorgestellt.

Publizierte Daten zeigen anschaulich, dass die katalytische Untereinheit der Telomerase hTERT (human telomerase reverse transcriptase) ein unabhängiger prognostischer Marker ist. Überexpression von hTERT in Neuroblastomen geht mit einer schlechteren Prognose einher (Krams et al., 2003).

Neben dem Alter bei Diagnosestellung als klinischer Prognosefaktor, ist die MYCN-Kopienzahl der wichtigste molekulare prognostische Marker (Christiansen et al., 1995). Patienten aller Stadien mit MYCN Amplifikation zeigen eine schlechtere Prognose, als solche ohne Amplifikation des MYCN-Gens. Die 5-Jahres-Ereignisfreie-Überlebenszeit (als Ereignis gelten Rezidiv oder Tod) für Patienten ohne Amplifikation des MYCN-Gens beträgt 75 % gegenüber 31 % bei Patienten deren Tumor MYCN amplifiziert ist.

Die Ausdifferenzierung von neuronalen Strukturen und Funktionen werden im Wesentlichen über die Neurotrophine und deren Rezeptoren vermittelt.

In Neuroblastomen spielen die Neurotrophinrezeptoren der Tyrosin-Kinase-Familie (trk) eine große Rolle. Zu dieser Familie gehören die Tyrosin-Kinasen trkA, trkB und trkC (Klein et al., 1991). Die Expression von trkA ist mit niedrigen INSS-Stadien (Alter  $<1$  Jahr, Stadium: 1, 2 und 4S), einer guten Langzeitprognose und invers mit der MYCN Amplifikation assoziiert (Nakagawara et al., 1992; Nakagawara et al., 1993).

TrkC wird mit trkA koexprimiert und ist als prognostisch günstiger Marker, wie die verkürzte Variante von trkB anzusehen, während MYCN amplifizierte Tumore und

Tumore fortgeschrittener Stadien häufig eine Expression des vollständigen trkB-Rezeptors aufweisen (Nakagawara et al., 1994).

Berwanger et al. zeigten, dass die Expression der Non-Rezeptor Tyrosin-Kinase FYN, ein von der MYCN-Kopienzahl unabhängiger prognostischer Marker ist.

Es besteht eine strenge Korrelation zwischen FYN-Expression und den Tumorstadien.

Im Stadium 1 findet sich eine hohe Expression des FYN-Gens, wohingegen im Stadium 4 eine niedrige bzw. fehlende FYN-Expression beobachtet werden konnte (Berwanger et al., 2002).

Ein weiterer molekulargenetisch prognostischer Marker ist die Expression des Oberflächenantigens CD44. Die Überexpression korreliert mit dem Grad der Tumordifferenzierung und mit einer günstigen Prognose. Es konnte gezeigt werden, dass die kumulative, ereignisfreie Überlebensrate bei Patienten mit CD44 Überexpression signifikant höher ist, im Vergleich zu Patienten mit negativer CD44 Expression (Combaret et al., 1995).

## **1.2 MYCN**

Dem Onkogen MYCN wird in der Entstehung des Neuroblastoms eine Schlüsselrolle zugeordnet und die Bestimmung seiner genomischen Amplifikation ist einer der aussagekräftigsten molekulargenetischen Prognosefaktoren für das Neuroblastom (Brodeur et al., 1984; Maris et al., 1999). MYCN ist neben dem Neuroblastom bei der Entstehung weiterer Tumore, wie dem Burkitt-Lymphom, dem kleinzelligen Bronchialkarzinom, sowie dem Mamma- und Prostata-Karzinom involviert (Schwab et al., 1985 und 1990).

Zur MYC-Gen-Familie gehören neben MYCN auf Chromosom 2q24.1 weitere Gene mit onkogenem Potential und ähnlichen DNA-Bindecharakteristika (Mukherjee et al., 1992). MYCL auf Chromosom 1p31, c-MYC auf Chromosom 8q24.12-q24.13 sowie S-myc und B-myc (Takahashi et al., 1991; Nau et al., 1985). S-myc ist eine natürlich vorkommende, verkürzte Variante von c-MYC, charakterisiert durch das Fehlen von circa 100 Aminosäuren am N-Terminus. B-myc hingegen kommt in hohen Konzentrationen im Gehirn vor und ist durch den Verlust von Aminosäuren am C-Terminus definiert (Resar et al., 1993; Gregory et al., 2000).



Myc-Proteine sind basische Phosphoproteine, die der Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper (bHLH-LZ)–Proteinfamilie angehören und als Transkriptionsfaktoren an DNA binden können (Henriksson und Lüscher, 1996; Lemaitre et al., 1996; Prendergast, 1997).

Nach Funktion und Struktur lässt sich Myc in drei Abschnitte untergliedern.

Die C-terminale Domäne enthält die basische Region für die DNA-Bindung und die HLH-Leucin-Zipper-Domäne für die Protein-Protein-Interaktion (Blackwell et al., 1990). Die N-terminale Domäne enthält zwei hochkonservierte Strukturen, die Myc-Boxen I und II, die für alle biologischen Funktionen von Myc verantwortlich sind.

Protoonkogene sind wichtige Gene im menschlichen Genom und normalerweise an der Regulation von Wachstumsprozessen und der Zelldifferenzierung beteiligt. Durch verschiedene Faktoren kann ein Protoonkogen in ein transformierendes Onkogen überführt werden, zum Beispiel durch Deletionen, Chromosomentranslokationen, Genamplifikationen, Punktmutationen oder durch den Einbau von viralen Genbestandteilen nach Virusinfektionen.

Beispiele für durch MYCN Aktivierung hervorgerufene Tumore sind die durch Papillomaviren induzierten Genitaltumore und die durch Hepadnaviren induzierten Lebertumore (Couturier et al., 1991; Fourel et al., 1990).

Durch ektopische Expressionsanalysestudien konnten verschiedene biologische Funktionen des MYC-Gens definiert werden, unter anderem Induktion von Apoptose, Blockade der Zelldifferenzierung, Immortalisierung und maligne Transformation von Zellen (Henriksson und Lüscher, 1996; Askew et al., 1991; Marcu et al., 1992).

Für diese pathologischen Vorgänge ist die strukturelle Integrität der Myc-Boxen, des bHLH/LZ- und des Leucin-Zipper-Motives erforderlich (Stone et al., 1987).

Weiterhin ist Myc essentiell für den normalen Ablauf des Zellzyklus (Lutz et al., 1996). Für die Ausübung biologischer Funktionen benötigt Myc das Partnerprotein Max, mit dem es als Heterodimer an spezifische DNA-Sequenzen, den so genannten E-Boxen bindet. Mutationen der DNA-Binde-Domäne führen zum Verlust aller biologischen Eigenschaften von Myc (Stone et al., 1987). Neben dem Dimerisationspartner Max gibt es noch andere Partnerproteine, die mit Myc an der C-terminalen Domäne interagieren. Miz-1, ein Protein mit Zink-Finger und transkriptionsreprimierender Domäne, Nmi, ein Protein mit Leucin-Zipper-Strukturen und weitere Proteine mit Einfluss auf die transkriptionsmodulierenden Eigenschaften von Myc (Bao et al., 1996; Peukert et al.,

1997). An der N-terminalen Domäne binden unter anderem TRRAP, p107 und Bin-1 (box-dependent-myc-interacting protein), ein vermeintlicher Tumorsuppressor (Sakamuro et al., 1996; Elliot et al., 1999; McMahon et al., 1998). Bin-1 führt zur Inhibition der potentiellen onkogenen Eigenschaften von Myc. Überexpression von Bin-1 führt in etablierten Zelllinien zur Differenzierung, G1-Arrest und auch zur Apoptose (Galderisi et al., 1999). Für die Transkriptionsregulation seiner Zielgene benötigt Myc, TRRAP einen Myc-Box II assoziierten Kofaktor (McMahon et al., 1998; Saleh et al., 1998).

Apoptose ist als programmierter Zelltod definiert. Im Rahmen der Apoptose kommt es zu charakteristischen Veränderungen, wie dem Abschnüren von Plasmamembranteilen, zur Chromatinkondensation und zum Schrumpfen der Zelle (Wyllie et al., 1993).

Myc ist in der Lage unter bestimmten Umständen Apoptose zu induzieren. Die Apoptosevorgänge werden über unterschiedliche Aktivierungswege, wie dem p53/Bax, PI3`K/AKT und über die Rezeptorgruppen TNF-R und CD95/Fas vermittelt. Die genannten Aktivierungswege münden in einer gemeinsamen Endstrecke aus einer Reihe hintereinandergeschalteter Proteasen, so genannter Kaspasen, die den programmierten Zelltod einleiten (Thornberry und Lazebnik, 1998). Der genaue Mechanismus der Myc vermittelten Apoptoseinduktion ist noch nicht völlig geklärt und es wird diskutiert, ob die hierzu nötigen Signalwege in Tumoren mutiert und somit inaktiv sind (Blyth et al., 2000).

Unter bestimmten Umständen vermittelt Myc Apoptose und limitiert dadurch zum Teil die von ihm regulierten, proliferationsfördernden Prozesse (Eilers et al., 1989).

Für den gerichteten Ablauf des Zellzykluses ist Myc unentbehrlich. MYC-Überexpression führt in wachsenden Zellen zum vorzeitigen Eintritt in die S-Phase mit Verkürzung der G1-Phase (Lutz et al., 1996; Karn et al., 1989). Die ektope MYC Expression führt in ruhenden Zellen zum erneuten Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus (Eilers et al., 1989; Steiner et al., 1995; Kaczmarek et al., 1985).

Davis et al. konnten zeigen, dass es am Tiermodell mit Inaktivierung beider c-MYC Allele durch Knockout zum vorzeitigem Tod in der Embryonalperiode kam (Davis et al., 1993).

Das MYCN Onkogen hat eine besondere Stellung in der Karzinogenese des Neuroblastoms und ist dessen wichtigster molekularprognostischer Marker. Bei etwa

25% aller Neuroblastome liegt eine MYCN Amplifikation vor, die mit höheren Tumorstadien und mit einer schlechteren Tumorprognose assoziiert ist (Brodeur et al., 1984; Seeger et al., 1988). Eine Überexpression des MYCN Genproduktes wird sowohl in Neuroblastomen mit, als auch in Neuroblastomen ohne MYCN Genamplifikation beobachtet und hat nur eingeschränkten prognostischen Wert (Nisen et al., 1988).

Die Transformationseigenschaften von N-Myc werden durch das Zusammenspiel von transkriptioneller Aktivierung- und Genrepression determiniert, wobei die Regulation von c-MYC besser charakterisiert ist.

Zahlreiche Zielgene, wie die katalytische Untereinheit der Telomerase hEST2/TERT werden durch Myc reguliert (Greenberg et al., 1999; Wang et al., 1998).

Wu et al. konnten zeigen, dass hTERT durch c-MYC transkriptionell aktiviert wird (Wu et al., 1999).

Die Lebensdauer humaner Zellen wird durch die Telomerlänge bestimmt (Ramirez et al., 2001). Eine erhöhte Telomeraseaktivität ist mit zellulärer Immortalisierung vergesellschaftet und neben einer Repression von p53 und pRb notwendig, um humane Zellen zu transformieren.

Ferner konnten Herold et al. in ihrer Arbeit zeigen, dass c-MYC die Transkription von p21 negativ reguliert (Herold et al., 2002).

Auch bei N-Myc sind einige Zielgene bekannt, darunter MDM2, MCM7, MRP1 und HMGA1, die insgesamt mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind.

Gemeinsam ist diesen Genen, dass sie in MYCN amplifizierten Tumoren hochreguliert werden.

Das Protoonkogen, MDM2, ist ein direktes Zielgen von N-Myc und inhibiert die p53 vermittelte Apoptose (Slack et al., 2005).

Ein weiteres Myc-Zielgen ist MCM7, dessen Genprodukt in die Regulation der DNA-Replikation involviert ist (Shohet et al., 2002).

Pajic et al. konnten zeigen, dass MRP1 in MYCN amplifizierten Tumoren hochreguliert wird und Zytostatika-Therapieresistenz vermittelt (Pajic et al., 2005).

HMGA1, ein potentielles Protoonkogen, reguliert Zellwachstum- und Differenzierung (Giannini et al., 2005).

Letztendlich haben einige Microarray-Untersuchungen an Neuroblastomen gezeigt, dass MYCN amplifizierte Tumore ein unterschiedliches Expressionsprofil haben (Khan et al., 2005; Schramm et al., 2005).

Zielgene, die in die Proteinsynthese, den Metabolismus und den Zellzyklus involviert sind, werden aktiviert, während andere Zielgene, die für Differenzierung, Wachstumsarrest und Apoptose verantwortlich sind, inhibiert werden. Diese stellt eine mögliche Wirkungsweise von MYCN in Neuroblastomen dar (Berwanger et al., 2002).

Ausgangspunkt der vorliegenden Dissertation war die Beobachtung, dass in Microarray-Experimenten MYCN nicht amplifizierte Neuroblastome andere Expressionsprofile zeigten, als die MYCN amplifizierten Neuroblastome.

### **1.3 cDNA-Microarray**

Die cDNA-Microarray Technologie ist in der Lage Gen-Expressionsprofile von tausenden von Genen in einem einzelnen Experiment zu erfassen (Skena et al., 1995; Skena et al., 1996; Lockhart et al., 1996). Gemessen wird mRNA relativ zur einer Referenz. Damit können beispielsweise Unterschiede in der Expression verschiedener Gene zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe untersucht werden. Potentiell sind so Aussagen über den Beitrag von Genen zur Tumorentstehung möglich, die dann Ansatzpunkte zur Entwicklung weiterer Therapieansätze sein können.

Bei der cDNA-Microarray Technik werden mehrere tausend genspezifische cDNA Sequenzen auf einem speziellen Objektträger immobilisiert und anschließend mit fluoreszenzmarkierter cDNA hybridisiert (Skena et al., 1995). Aus den Fluoreszenzintensitäten einzelner Signale resultieren Aussagen über die relative Expressionsaktivität einer bestimmten Zielsequenz. Die cDNA-Microarray Technik bildet hier die beste Forschungsmöglichkeit in Ergänzung zu anderen Expressionsanalysetechniken, wie Northern-Blot, S1 nuklease Protektion, dd PCR, cDNA Bibliothek Sequenzierung, SAGE und In Situ Hybridisierung (Alwin et al., 1977; Berk et al., 1977; Okubo et al., 1992; Velculescu et al., 1995).

Experimente mit Microarrays enthalten zahlreiche potentielle Fehlerquellen, wie mRNA-Degradierung während der Präparation, unspezifische Hybridisierung und schlechte RNA-Qualität aus heterogenem Tumormaterial. Weitere Fehlerquellen können bei der Herstellung der Objektträger im eigenen Labor auftreten (Sequenzen können aus Bibliotheken stammen, die bis zu 5 % fehlerhafte Anotationen haben).

Eine weitere Einschränkung beinhaltet die limitierte Anzahl an Versuchswiederholungen der Microarray-Experimente aufgrund der hohen Kosten und der komplexen Datenauswertung.

Dieser Umstand erfordert die Validierung der Microarray-Genexpressionsdaten anhand alternativer Methoden, wie der quantitativen real-time PCR (Bustin et al., 2000). Weitere Methoden zur Validierung sind beispielsweise Northern-Blot Analysen, die In Situ Hybridisierung (Parker und Barnes, 1999) und der RNase Protektion Assay (Hod, 1992; Saccomanno et al., 1992).

#### **1.4 PCR als Validierungsmethode für Microarray-Experimente**

Mit der weiten Verbreitung der real-time Systeme in den letzten Jahren stieg auch die Zahl der Publikationen über die real-time PCR stark an.

Eines der wichtigsten Anwendungsgebiete der real-time PCR ist die Validierung der Daten von Microarray-Analysen (Rajeevan et al., 2001).

Die entscheidenden Vorteile der real-time PCR gegenüber anderen Verfahren PCR-basierter Quantifizierung von Nukleinsäuren sind der extrem große dynamische Bereich und der hohe Grad der Verlässlichkeit der Ergebnisse, da nicht nur die Produktmenge einmalig nach der PCR analysiert wird, sondern die Kinetik der gesamten Reaktion sichtbar ist (Higuchi et al., 1993). Abweichende Amplifikationseffizienzen in den individuellen Reaktionsansätzen lassen sich somit leicht identifizieren.

Rajeevan et al. validierten Microarray-Genexpressiondaten an 24 ausgewählten Genen mit der SYBR Green real-time PCR. In 71 % der Fälle (17 von 24) wurden die gefundenen Gene als reguliert verifiziert. Ferner beobachteten Rajeevan et al., dass solche Gene, die anhand der Microarray-Experimenten als zwei- bis vierfach reguliert gefunden wurden, ohne die Validierung durch die real-time PCR nicht eindeutig als differentiell reguliert angesehen werden können (Rajeevan et al., 2001; Liew et al., 2006).

Mutch et al. konnten eine Übereinstimmung der Expressionsergebnisse beider Methoden in 86 % der untersuchten Gene feststellen (Mutch et al., 2002).

Diese Beobachtungen wurden auch durch Jenson et al. gemacht. Etwa 80 % der durch Microarray-Analysen erhaltenen differentiell exprimierten Gene konnten durch die real-time PCR validiert werden (Jenson et al., 2003).

In einer weiteren Publikation wurde zur Validierung der Microarray-Genexpressionsmuster ebenfalls das real-time Verfahren angewendet. Auch in dieser Arbeit wurden 70 % (17 von 21) der ausgewählten Kandidatengene als reguliert verifiziert (Rajeevan et al., 2001).

Die Aktivität von Genen, die in Expressionsstudien anhand von Transkriptonsprofilen aus Microarray-Analysen identifiziert wurden, lässt sich durch den Einsatz von real-time PCR basierter Verfahren kostengünstig und schnell in Abhängigkeit verschiedener Parameter verifizieren (Rajeevan et al., 2001).

Zusammenfassend ist die real-time PCR ein geeignetes und schnelles Verfahren um Microarray-Experimente zu validieren

### **Fragestellung**

In zahlreichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die MYCN Amplifikation von besonderer biologischer wie prognostischer Bedeutung für das Neuroblastom ist.

Um weitere Zielgene von N-Myc zu identifizieren wurden mittels Microarray Technologie MYCN amplifizierte mit MYCN nicht amplifizierten Tumorproben verglichen. Damit ist es möglich, Veränderungen im Expressionsmuster von mehreren 1000 Genen zu detektieren.

Ziel dieser Arbeit war die Validierung der Microarray-Expressionsdaten von 5 ausgewählten Genen an MYCN amplifizierten und MYCN nicht amplifizierten Tumorproben mittels quantitativer real-time PCR, wobei nach Microarray-Expressionsanalyse 3 hochregulierte (MYCN, TRAP1 und Aurora-A) und 2 herunterregulierte Gene (EFNB3 und SOCS-1) ausgewählt wurden.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob diese Gene im Zellkultursystem MYCN reguliert sind. Daher wurde mit Hilfe der MYCN induzierbaren Neuroblastomzelllinie SHEP Tet21/N, die Expression von MYCN, Aurora-A und TRAP1 untersucht.

Publizierte Daten konnten bereits zeigen, dass Aurora-A in Tumorproben und auch in der Neuroblastomzelllinie HTB10 genomisch amplifiziert ist (Zhou et al., 1998). Aurora-A kodiert für eine Zentrosomen assoziierte Kinase, deren Überexpression zur Zentrosomenamplifikation und Chromosomeninstabilität führt.

Zuletzt wurde eines der regulierte Gene, Aurora-A, auf genomische Amplifikation mittels Taqman-Verfahren untersucht.

## **Material und Methoden**

### **3.1 Tumormaterial**

Das in dieser Arbeit verwendete Tumormaterial wurde von Herrn Prof. Dr. med. Christiansen, Medizinisches Zentrum für Kinderheilkunde der Universität Marburg, zur Verfügung gestellt.

Die Tumorproben werden nach Operation, Biopsie oder Punktion von den Mitgliedern der Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) in das Medizinische Zentrum für Kinderheilkunde der Universität Marburg versandt. Hier wird das Material sofort aufgearbeitet und bei -80 °C eingefroren. Der Nachweis der MYCN Amplifikation wird im Neuroblastomlabor routinemäßig bestimmt. Alle Angaben bezüglich der Stadieneinteilung und weitere klinische Daten stammen aus den einsendenden Kliniken.

Hinsichtlich der Stadien- und Altersverteilung stellen die untersuchten Tumore eine annähernd repräsentative Auswahl der Gesamtneuroblastome der Bundesrepublik Deutschland dar.

Die hier untersuchten Tumorproben wurden aus der Neuroblastomtumorbank entnommen und setzen sich aus insgesamt 20 MYCN amplifizierten und 22 MYCN nicht amplifizierten Proben zusammen.



| Nr. | MYCN-<br>Status | Stad. | Alter<br>(Mon) | Status        |
|-----|-----------------|-------|----------------|---------------|
| 1   | amp.            | 4S    | 7,2            | überl.        |
| 2   | amp.            | 4S    | 1,3            | <b>verst.</b> |
| 3   | amp.            | 3     | 12,5           | <b>verst.</b> |
| 4   | amp.            | 1     | 14,9           | überl.        |
| 5   | amp.            | 4     | 3,1            | <b>verst.</b> |
| 6   | amp.            | 4     | 62,8           | <b>verst.</b> |
| 7   | amp.            | 2     | 12,8           | überl.        |
| 8   | amp.            | 4     | 14,8           | <b>verst.</b> |
| 9   | amp.            | 4     | 19,5           | überl.        |
| 10  | amp.            | 4S    | 0,5            | überl.        |
| 11  | nicht amp.      | 1     | 13,3           | überl.        |
| 12  | nicht amp.      | 1     | 9,5            | überl.        |
| 13  | nicht amp.      | 2     | 18,6           | <b>verst.</b> |
| 14  | nicht amp.      | 3     | 3,7            | überl.        |
| 15  | nicht amp.      | 1     | 5,4            | überl.        |
| 16  | nicht amp.      | 4     | 31,5           | <b>verst.</b> |
| 17  | nicht amp.      | 3     | 19,1           | überl.        |
| 18  | nicht amp.      | 4S    | 7,9            | überl.        |
| 19  | nicht amp.      | 1     | 2,9            | überl.        |
| 20  | nicht amp.      | 4S    | 9,8            | überl.        |
| 21  | nicht amp.      | 4S    | 2,7            | überl.        |
| 22  | nicht amp.      | 3     | 1,3            | überl.        |

| Nr. | MYCN-<br>Status | Stad. | Alter<br>(Mon) | Status        |
|-----|-----------------|-------|----------------|---------------|
| 23  | amp.            | 3     | 37,5           | <b>verst.</b> |
| 24  | amp.            | 4     | 131            | <b>verst.</b> |
| 25  | amp.            | 4     | 77,8           | überl.        |
| 26  | amp.            | 4     | 7,9            | <b>verst.</b> |
| 27  | amp.            | 4     | 29,9           | <b>verst.</b> |
| 28  | amp.            | 4     | 32,9           | <b>verst.</b> |
| 29  | amp.            | 3     | 37,5           | überl.        |
| 30  | amp.            | 1     | 6,6            | überl.        |
| 31  | amp.            | 3     | 20,8           | überl.        |
| 32  | amp.            | 4     | 25,2           | <b>verst.</b> |
| 33  | nicht amp.      | 4     | 35,8           | überl.        |
| 34  | nicht amp.      | 3     | 69,1           | überl.        |
| 35  | nicht amp.      | 1     | 16,1           | überl.        |
| 36  | nicht amp.      | 1     | 8,1            | überl.        |
| 37  | nicht amp.      | 1     | 55,3           | überl.        |
| 38  | nicht amp.      | 2     | 14,9           | überl.        |
| 39  | nicht amp.      | 3     | 14,1           | überl.        |
| 40  | nicht amp.      | 4     | 34,3           | <b>verst.</b> |
| 41  | nicht amp.      | 4     | 44,8           | überl.        |
| 42  | nicht amp.      | 1     | 1,1            | überl.        |

**Tab. 3.1**

Vergleiche der klinischen Patientenparameter. Das Alter bezieht sich auf den Zeitpunkt der Diagnosestellung. Der Status wurde in der Nachbeobachtungszeit bis zum 11.06.2004 erhoben.

### 3.2 Isolierungen genomischer DNA aus kultivierten Neuroblastomzelllinien

- Ausgangsmaterial für die genomische Amplifikationsuntersuchung mittels Taqman PCR-

#### Material und Chemikalien

- PBS-Puffer
- Proteinase K\*
- Buffer AL\*
- Buffer AW\*
- Buffer AE\*
- Ethanol (96-100 %) (Riedel-de Haen)
- QIAamp Spin columns\*
- 2 ml Collection tubes\*
- 1.5 ml Eppendorf-Gefäß

\*Qiagen (QIAamp DNA Mini Kit)

#### Methode

Die Zelllinien IMR-32, Kelly, SHEP, LAN5 und SH-SY5Y wurden standardmäßig auf 15 cm Zellkulturplatten angezüchtet. Die Zellernte und auch die DNA-Isolierung erfolgten gemäß den Anweisungen des Herstellers nach dem "Qiagen Protocol for cultured cells". Zuerst wurden die Zelllinien, die sich auf der Zellkulturplatte befinden, vom Nährmedium befreit. Mit einem Spatel wurden die Zelllinien von der Zellkulturplatte vorsichtig gelöst, um sie in ein Eppendorf-Gefäß zu überführen. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt bei 300 U/min für 5 Minuten. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Der Überstand wurde komplett verworfen ohne das entstandene Zellkonglomerat zu zerstören. Der Zellhaufen wurde mit 200 µl PBS-Puffer in Lösung gebracht und mit 20 µl Proteinase K versetzt, um die Zellen enzymatisch zu lysieren. Im nächsten Schritt wurden 200 µl AL-Puffer hinzupipettiert. Um eine homogene Zellsuspension zu erhalten, wurden die Proben gut durchmischt und anschließend in einem Wasserbad bei 56 °C für 10 Minuten inkubiert. Zu den Proben wurden 200 µl Ethanol 100 % hinzugefügt und gut durchmischt, um die DNA auszufällen. Der gesamte Probenansatz wurde in die Micro-Spin-Säulen überführt und bei 8000 U/min für eine Minute zentrifugiert. Die DNA wurde während der Zentrifugationsperiode an die Membran der Micro-Spin-Säulen gebunden. Die

abzentrifugierte Lösung wurde verworfen. Es folgten zwei Aufreinigungsschritte mit Zugabe von jeweils 500 µl AW-Puffer über den Filter und Abzentrifugation desselben über die DNA für eine Minute bei 8000 U/min. Die abzentrifugierte Lösung wurde dabei immer verworfen. Um den restlichen Waschpuffer zu eliminieren wurden die Säulen ohne weitere Zugabe für eine Minute bei 14000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurden 200 µl AE-Puffer über den Filter pipettiert und die DNA nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur in ein sauberes Eppendorfgefäß abzentrifugiert (1 Minute bei 8000 U/min).

Die DNA-Konzentration der erhaltenen Lösung wurde photospektrometrisch bestimmt. Fünf µl der erhaltenen DNA-Lösung wurden in 495 µl Aqua-dest. verdünnt und in einem Zweistrahlphotometer (PerkinElmer UV/VIS Spectrometer) vermessen. Dabei wurden die Extinktionen bei 260 nm und bei 280 nm bestimmt. Die optische Dichte einer Nukleinsäurelösung bei 260 nm (OD 260) ist ein Maß für die Konzentration an Nukleotiden. Die OD 280 gibt Aufschluss über die Verunreinigung mit Proteinen. Eine vergleichbar reine DNA liegt bei einer Extinktionsratio (Ext.260 nm/Ext.280 nm) zwischen 1,8 und 2,0 vor. Die Messung wurde in speziellen Quarzküvetten vorgenommen, da diese keine Eigenabsorption im UV- Bereich besitzen.

### 3.3 Isolierungen genomischer DNA aus Neuroblastomtumormproben

-Ausgangsmaterial für die genomische Amplifikationsuntersuchung mittels Taqman PCR-

#### Material und Chemikalien

- Proteinase K\*
- Buffer AL\*
- Buffer ATL\*
- Buffer AW\*
- Buffer AE\*
- Ethanol (96-100 %) (Riedel-de Haen)
- QIAamp Spin columns\*
- 2 ml Collection tubes\*
- 1.5 ml Eppendorf-Gefäß
- RNase (Sigma)
- Jeweils 25 mg Tumorgewebe (-80 °C)

\*Qiagen (QIAamp DNA Mini Kit)

### **Methode**

Die DNA-Isolierung aus nativem Neuroblastomtumorgewebe erfolgte nach dem Qiagen-Tissue-Protokoll. Um die Membranlyse zu beschleunigen ist es wichtig, das Tumorgewebe zunächst in einer sterilen Petrischale zu zerkleinern. Etwa 25 mg Tumorgewebe wurden in ein 1.5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und mit 180 µl ATL-Puffer überschichtet. Anschließend wurden 20 µl Proteinase K hinzupipettiert und die Proben in einem Wasserbad solange bei +56 °C inkubiert, bis das Gewebe vollständig lysiert war. Die RNA-Verdauung erfolgte durch Zugabe von 20 µl RNase bei Zimmertemperatur für 2 Minuten. Nach Homogenisierung und Zugabe von 200 µl AL-Puffer wurde dieses Gemisch für 10 Minuten bei +70 °C im Wasserbad inkubiert. Zu den Proben wurden dann 200 µl Ethanol 100 % gegeben, um die DNA auszufällen. Das weitere Vorgehen erfolgte wie in Abschnitt 3.2 beschrieben.

## **3.4 RNA-Isolierungen aus Neuroblastomtumorproben**

-Ausgangsmaterial für die Genexpressionsuntersuchungen mittels SYBR Green real-time PCR-

### **Material und Chemikalien**

- RNeasy midi columns in 15 ml tubes\*
- 15 ml Collection tubes\*
- Buffer RLT\*
- Buffer RW1\*
- Buffer RPE\*
- RNase-freies Wasser\*
- Ethanol 70 % (Riedel de –Haen)
- 10-15 ml tubes
- Aqua-dest. ad injectabile (Braun)
- jeweils 50 mg Tumorgewebe (-80 °C)

\*Qiagen (RNeasy Midi Kit)

## **Methode**

Die RNA-Isolierung aus Tumorproben von jeweils 50 mg erfolgte nach den Qiagen-Tissue-Protokoll. Die Gesamt-RNA wurde nach der Guanidiumthiozyanat-Phenol-Chloroform Methode isoliert (Chomczynski und Sacchi, 1987). Dabei erfolgten alle Schritte des Protokolls bei Raumtemperatur. Der Gewebeverband der Tumorproben wurde zunächst lysiert und anschließend homogenisiert. Durch die Behandlung der Proben mit guanidiumthiozyanathaltigem (GITC) Puffer wurde die RNase sofort inaktiviert. Durch Zugabe von Ethanol wurden optimale Bedingungen geschaffen, um die RNA an die Silicagel-Membran zu binden. Die gewonnene Suspension wurde über ein Säulenzentrifugationsverfahren aufgereinigt, um verbleibende Kontaminationen zu eliminieren dreifach gewaschen und anschließend durch RNase-freies Aqua-dest. in Lösung gebracht.

Nach Zugabe von 2 ml RLT-Puffer wurden die Proben homogenisiert. Anschließend wurde die Gewebesuspension für 10 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert und der entstehende Überstand vorsichtig in ein sauberes RNase-freies Gefäß überführt. Der homogene Überstand wurde mit 2 ml Ethanol 70 % versetzt, gut durchmischt, in die RNeasy midi Säulen überführt und anschließend für 5 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert. Während der Zentrifugationsperiode wurde die RNA an die Membran der RNeasy midi Säule gebunden. Um die Membran von restlichen Kontaminationen zu reinigen folgten drei Aufreinigungsschritte. Die Säulen wurden mit 4 ml RW1-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert. Es schloss sich ein weiterer Aufreinigungsschritt durch Zugabe von 2,5 ml RPE-Puffer und erneuter Zentrifugation bei 4000 U/min an. Um verbleibende Ethanolreste zu eliminieren wurde die Säule erneut mit 2.5 ml RPE-Puffer überschichtet und für 5 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert. Die abzentrifugierte Lösung wurde immer verworfen. Nach Zugabe von 150 µl RNase-freiem Aqua-dest. wurde dieses Gemisch bei Raumtemperatur für eine Minute inkubiert und für 3 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert. Die erhaltene RNA wurde in ein RNase-freies Gefäß eluiert. Durch Wiederholung des letzten Schrittes konnte der RNA-Ertrag um 15-30 % gesteigert werden.

Die gewonnene RNA-Konzentration wurde mit einem Spektrophotometer bei 260 nm gegen Aqua-dest. bestimmt. Auch hier wurde der Quotient der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm bestimmt, um die Reinheit der erhaltenen Ribonukleinsäuren zu ermitteln. Ein Quotient zwischen 1,8 und 2,0 zeigt eine vergleichbar reine RNA an.

### 3.5 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

#### Material und Chemikalien

- RNAsin® RNase-Inhibitor 40 Units/μl (Promega)
- Oligo-Primer (dT)<sub>15</sub> (Stratagene)
- 5x-First-Strand-Buffer (GibcoBRL)
- DDT 0,1 molar (GibcoBRL)
- GeneAmp®dNTPs (Applied Biosystems)
- Aqua-dest. (Braun)
- Super-Script-II®-Reverse-Transkriptase (GibcoBRL)

#### Methode

Die Gesamt-RNA wurde nach folgendem Protokoll in zwei Schritten umgeschrieben. Zunächst wurden 10 μg Gesamt-RNA mit 4 μl Oligo-Primer (dT)<sub>15</sub> in ein autoklaviertes 1.5 ml Eppendorf-Gefäß vorgelegt und auf ein Gesamtvolumen von 35 μl mit Aqua-dest. aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten in einem Wasserbad bei 65 °C inkubiert. Während dieser 5-minütigen Inkubationszeit wurde ein aus 12 μl 5x-First-Strand-Buffer, 6μl DDT, 1 μl RNAsin® sowie je aus 1 μl dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) bestehender Mastermix zusammenpipetiert. Nach der Inkubationszeit wurde dem 1.5 ml Eppendorf-Gefäß der Mastermix zugesetzt und für 2 Minuten in einem Wasserbad bei 42 °C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Proben mit jeweils 1 μl Super-Script® versetzt und für 60 Minuten in einem Wasserbad bei 42 °C und anschließend, um die Reaktion zu inaktivieren, für 15 Minuten in einem Wasserbad bei 72 °C inkubiert. Die erhaltene Gesamt-cDNA wurde bis zum PCR-Einsatz im Reaktionsgemisch bei –20 °C gelagert.

### 3.6 PCR ( Polymerasekettenreaktion)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur in vitro Amplifikation von spezifischen DNA bzw. cDNA (complementary DNA) Sequenzen. Mit dieser Technik ist es möglich mRNA Expressionsmuster zu charakterisieren und RNA Strukturen zu analysieren. Zunächst ist es erforderlich mRNA in cDNA umzuschreiben. Das Prinzip der PCR wurde erstmals 1985 durch Randal K. Saiki beschrieben und beruht auf einer zyklischen Wiederholung dreier Reaktionsschritte, die bei unterschiedlichen Temperaturen ablaufen (Saiki et al., 1985).

Im ersten Schritt wird die zu amplifizierende DNA-Matrize durch Hitze denaturiert. Die DNA-Stränge lösen sich voneinander und ermöglichen im nächsten Schritt die Primer-Anlagerung. Als Primer kann ein synthetisch herstellbares Oligonukleotid von beispielsweise 20 Nukleotiden Länge eingesetzt werden, das nach Bindung an die komplementäre Basensequenz den Startpunkt am 5'-Ende des neu zu synthetisierenden DNA-Stranges festlegt. Anschließend wird die Amplifikationsreaktion durch die DNA-Polymerase in 3'-Richtung katalysiert. Es kommt zur Anlagerung einzelner Nukleotide komplementär zum entsprechenden Einzelstrang, bis die gesamte Sequenz durchlaufen ist oder ein spontaner Kettenabbruch stattfindet. Am Ende einer Reaktion liegen die DNA-Moleküle als Doppelstränge vor. Bei einer PCR wird die gewünschte Zielregion ab dem vierten Zyklus exponentiell vervielfältigt. Nach Abschluss der Reaktion lässt sich die Kopienzahl nach der Gleichung  $(2^n - 2n) \times x$  berechnen.

Dabei bedeutet:

- $n$  = Anzahl der Vermehrungszyklen;
- $2n$  = Produkte des ersten und zweiten Vermehrungszyklus;
- $x$  = Anzahl der Kopien der ursprünglichen der DNA-Matrize.

Die optimalen Bedingungen einer PCR sind nicht immer gleich und müssen für die jeweilige Sequenz empirisch herausgefunden werden.

Es gibt zahlreiche Parameter, die für eine Optimierung der PCR entscheidend sind.

- PCR-Temperaturprofil (Primeranlagerung, Verlängerung, Denaturierung, Aufheiz- und Abkühlzeiten, Anzahl der Zyklen)
- Aufbau und Konzentration der Primer
- Konzentration der Magnesiumionen
- Nukleotid-Konzentrationen

- Qualität und Konzentration der Matrice
- PCR-Puffer etc.

In dieser Arbeit wurden quantitative real-time PCRs mittels Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff kann spezifisch (Taqman) oder auch unspezifisch (SYBR Green) zur jeweiligen Zielsequenz sein.

## **Methode**

### **Grundprotokoll:**

Für die Vervielfältigung der DNA (bzw. cDNA) wurde ein Mastermix aus den für die jeweilige PCR benötigten Inhaltsstoffen zusammenpipettiert.

(Mastermixvolumen = Probenanzahl x 50 µl Einzelreaktionsvolumen).

Das Reaktionsvolumen für eine Einzelreaktion von 50 µl enthielt 5,9 µl 10x Reaktionspuffer, je 1 µl dNTP, 0,1 µl Taq-Polymerase, jeweils 1 µl eines jeden Primers (Tab. 3.2), 200 ng Proben DNA (bzw. cDNA) (entsprechend 1-5 µl Volumen). Das sich ergebende Volumen wurde auf ein Gesamtvolumen von 50 µl mit Aqua-dist. aufgefüllt, gut durchmischt und in einem Thermocycler (Perkin-Elmer, GenAmp PCR System 2400) nach verschiedenen Thermoprotokollen inkubiert (Tab. 3.2).

Abhängig von den jeweils empirisch bestimmten, optimalen PCR-Bedingungen kamen andere Temperaturen, Annealing- und Elongationszeiten, 10x Reaktionspuffer-Konzentrationen und je nach Erfordernis 1-2 µl der jeweiligen PCR-Zusätze (Tab. 3.2) zum Einsatz.



### **3.6.1 Quantitative Real-Time PCR**

-Genexpressionsuntersuchungen (SYBR Green) und genomische Amplifikationsanalysen (Taqman)-

#### **ICycler iQ-System**

Einführung :

Für die quantitative real-time PCR wurde das iCycler iQ-System von Bio-Rad Laboratories verwendet. In einer real-time PCR wird ein Fluoreszenzfarbstoff (Reporter) eingesetzt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff kann zur jeweiligen Zielsequenz spezifisch (Taqman) oder auch unspezifisch (SYBR Green) sein. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch eine externe Lichtquelle angeregt.

Das iCycler iQ-System besitzt eine 96 Loch-Platte und ein integriertes optisches System, um die Fluoreszenzsignale in jeder Position und in jedem Zyklus zu erfassen.

Die Positionen in der 96 Loch-Platte werden gleichzeitig gescannt und die Frequenz dieses Vorganges kann vom Benutzer vorher bestimmt werden.

Die detektierten Signale werden durch die mitgelieferte Software kompetent interpretiert.

### **3.6.2 SYBR Green PCR**

Bei der SYBR Green PCR initiieren die ungebundenen Fluorophormoleküle eine Hintergrundfluoreszenz. In der Amplifikationsphase werden die Fluorophormoleküle mit fortschreitender PCR-Reaktion in die neusynthetisierte Doppelstrang-DNA eingelagert, dessen Fluoreszenzsignal sich signifikant vom Hintergrundsignal unterscheidet. In der Denaturierungsphase gehen die Fluorophormoleküle erneut in Lösung und das Fluoreszenzsignal nimmt ab. Bei der Verwendung von SYBR Green fehlt allerdings die Spezifität hinsichtlich der zu untersuchenden DNA- (bzw. cDNA) Zielsequenz, denn auch Primer-Dimere oder Nebenprodukte, die sich während der Reaktion bilden, führen zu einem Fluoreszenzanstieg. Dieser Fluoreszenzanstieg ist initial nicht von dem des spezifischen Produkts zu unterscheiden. Eine Differenzierung zwischen spezifischem Produkt und Primer-Dimeren oder Nebenprodukten kann erst nach Abschluss der PCR-Reaktion mittels einer Schmelzkurvenanalyse erfolgen (Ririe et al., 1997). Die Schmelztemperatur (melting temperature  $T_m$ ) ist abhängig von der Nukleotidzusammensetzung der jeweiligen Zielsequenz. Bei der Schmelzkurvenanalyse werden die PCR-Produkte kontinuierlich über einen bestimmten Temperaturbereich aufgeheizt, bis sie ihrem Schmelzpunkt entsprechend nur noch als Einzelstrang

vorliegen. Die damit verbundene Fluoreszenzabnahme wird aufgezeichnet. Kleinere Fragmente wie z. B. Primer-Dimere weisen einen niedrigeren Schmelzpunkt auf als die spezifischen PCR-Produkte.

### **Material und Chemikalien**

- 10x Reaktionspuffer (50 mM TrisHCl, 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 150 µg/ml BSA, pH 9,2) (MoBiTec)
- Taq-Polymerase 25 U/µl (MoBiTec)
- dATP, dTTP, dGTP, dCTP, 0,1 µmol/1µl (Applied Biosystems)
- Sense und Antisense Primer 50 pmol/µl (Synthese : Fa. SIGMA- ARK)
- Proben DNA (bzw. cDNA)
- Aqua-dest. (Braun)
- Weitere Zusatzchemikalien (Tab. 3.2):

|                     |
|---------------------|
| Formamid (Sigma)    |
| DMSO (Merck)        |
| Q-Solution (Qiagen) |
| SYBR Green (Roche)  |

### **Methode**

Für die Versuche im iCycler iQ-System von Bio-Rad wurde als Fluoreszenzfarbstoff das SYBR Green von Roche Diagnostics verwendet. Vorher wurde das SYBR Green in einer Konzentration von 1:5000 in 1.5 ml Eppendorf-Gefäße aliquotiert. Der Mastermix wurde wie im Abschnitt 3.6 beschrieben zusammenpipetiert und anschließend mit je 5 µl SYBR Green pro Einzelreaktion versetzt. Das sich ergebende Volumen wurde auf ein Gesamtvolumen von 50 µl mit Aqua-dest. aufgefüllt und gut durchmischt. Um unterschiedliche Fluorophorkonzentrationen auszugleichen musste eine Kalibrierungsplatte angefertigt werden. Als Kalibrierungslösung wurde die 10-fach konzentrierte „External Well Factor Solution“ von Bio-Rad verwendet, die zunächst im Verhältnis von 1:10 verdünnt wurde. Aus diesem Gemisch wurden 50 µl in jede Position hineinpipetiert und anschließend wurde die Kalibrierungsplatte mit einer transparenten Folie (optically clear sealing film von Bio-Rad) abgedichtet. Im Anschluss wurde die Kalibrierungsplatte in den iCycler überführt und das jeweilige Programm gestartet. Nach Beendigung der Kalibrierungsphase wurde das Reaktionsvolumen in eine 96 Loch-Platte hineinpipetiert, mit einer transparenten Folie abgedeckt und im iCycler nach verschiedenen Thermoprotokollen inkubiert (Tab. 3.2).

### 3.6.3 Taqman PCR

Bei der Taqman PCR werden drei Oligonukleotide verwendet. Zusätzlich zum benötigten Primerpaar wird der Reaktion ein kurzes Oligonukleotid, das als Gensonde spezifisch an das entstehende PCR-Produkt bindet, zugesetzt. Taqman Sonden sind einzelsträngige Oligonukleotide, die an ihrem 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Reporter) und an ihrem 3'-Ende mit einer fluoreszenzauslöschenden Verbindung (Quencher) verknüpft sind. Im Falle einer vorhandenen Zielsequenz im PCR-Ansatz verlängert die DNA-Polymerase die spezifisch gebundenen Primer und stößt dabei auf die ebenfalls spezifisch gebundene Sonde, die aufgrund der 5'-3'-Nuklease-Aktivität der DNA-Polymerase abgebaut wird. Im Rahmen dieses Prozesses kommt es zur räumlichen Trennung zwischen Fluoreszenzfarbstoff und Quencher. Dieser emittiert somit Fluoreszenz definierter Wellenlänge, deren Intensität in Summe direkt proportional der Zahl der neu gebildeten DNA-Stränge ist. Da die 5'-Nuklease-Aktivität der DNA-Polymerase Doppelstrang spezifisch ist (Heid et al., 1996), bleiben ungebundene Taqman Sonden intakt und zeigen kein Fluoreszenzsignal. Zusammenfassend beruht die Taqman PCR auf der zyklischen Wiederholung zweier Reaktionsschritte. Zunächst wird die doppelsträngige DNA in einer Lösung mit den Primern, den Nukleotiden, dem Reaktionspuffer, den Sondenmolekülen, einer hitzestabilen DNA-Polymerase und evtl. weiteren Zusätzen durch Hitze denaturiert. Anschließend folgt die Primeranlagerung und Verlängerung in einem gemeinsamen Schritt.

#### Material und Chemikalien

- 10x Reaktionspuffer (50 mM TrisHCl, 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 150 µg/ml BSA, pH 9,2) (MoBiTec)
- dATP, dTTP, dGTP, dCTP, 0,1 µmol/1µl (Applied Biosystems)
- Supertaq-Polymerase (MoBiTec)
- Sense und Antisense Primer (Synthese: Fa. TIB MOLBIOL)
- Sonden (Synthese: Fa. TIB MOLBIOL)
- DNA aus Tumorproben und Neuroblastomzelllinien
- Aqua-dest. (Braun)
- Weitere Zusatzchemikalien (Tab. 3.2):                      Formamid (Sigma)

## **Methode**

Um das iCycler-System zu kalibrieren wurde im Vorfeld einer Taqman PCR eine Kalibrierungsplatte analog der Beschreibung in Abschnitt 3.6.2 angefertigt. Während der Kalibrierungsphase wurde der Mastermix wie in Abschnitt 3.6 beschrieben zusammenpipetiert und anschließend mit je 1.25 µl bzw. 1 µl Taqman Sonde pro Einzelreaktion versetzt. Das resultierende Volumen wurde auf ein Gesamtvolumen von 50 µl mit Aqua-dest. aufgefüllt und gut durchmischt. Nach Beendigung der Kalibrierungsphase wurde das Reaktionsvolumen in eine 96 Loch-Platte überführt, mit einer transparenten Folie (optically clear sealing film von Bio-Rad) abgedichtet und nach verschiedenen Thermoprotokollen im iCycler inkubiert (Tab. 3.2).

**Tab. 3.2:** Primer und PCR-Bedingungen

| <u>Name</u>                         | <u>Primer</u>                     | <u>Sequenz</u>   | <u>Temperaturschritte</u>   |
|-------------------------------------|-----------------------------------|--|---|
|                                     |                                   |  | Einmalig vor jeder PCR:<br>95°C 3:00 min  |
| <b>MYCN</b><br><i>real-time</i>     | <i>foreward (5')</i><br>1:8 verd. | 5'-AGC GGC GGC GAC CAC AAG GC-3'                             | 95°C 0:45 min<br>64°C 0:45 min<br>72°C 1:30 min<br>Zyklen: 32<br>Zusatz: 1 µl Formamid<br>4 µl DMSO<br>5 µl SYBR.                 |
|                                     | <i>reverse (3')</i><br>1:8 verd.  | 5'-CGA GTC AGA GTT TCG GGG GCT CAA GC-3'                     |   |
| <b>β-actin</b><br><i>real-time</i>  | <i>foreward (5')</i><br>1:4 verd. | 5'-CCT CGC CTT TGC CGA TCC-3'                                | 95°C 0:45 min<br>60°C 0:30 min<br>72°C 1:30 min<br>Zyklen: 36<br>Zusatz: 1 µl Formamid<br>4 µl DMSO<br>5 µl SYBR                  |
|                                     | <i>reverse (3')</i><br>1:4 verd.  | 5'-GGA TCT TCA TGA GGT AGT CAG TCA-3'                        |   |
| <b>TRAP1</b><br><i>real-time</i>    | <i>foreward (5')</i>              | 5'-GAG GCC CGG GTG CGA GAT GTG GTA AC-3'                     | 95°C 0:45 min<br>60°C 0:30 min<br>72°C 1:30 min<br>Zyklen: 36<br>Zusatz: 1 µl Formamid<br>5 µl SYBR                               |
|                                     | <i>reverse (3')</i>               | 5'-CTC CCG CAT GAA CAG GCC GTA ATC TT-3'                     |   |
| <b>SOCS</b><br><i>real-time</i>     | <i>foreward (5')</i><br>1:2 verd. | 5'-AAG AGA TCG AGA TTA CGT ACT A-3'                          | 95°C 0:45 min<br>60°C 0:45 min<br>72°C 1:30 min<br>Zyklen: 30<br>Zusatz: 10 µl Q-Solu.<br>5 µl SYBR                               |
|                                     | <i>reverse (3')</i><br>1:2 verd.  | 5'-TTA TTT TTC TGA CCA CCA TCA CTA-3'                        |   |
| <b>EFNB3</b><br><i>real-time</i>    | <i>foreward (5')</i><br>1:5 verd. | 5'-GCA GGG AGG TGT GTG CCT AAC CAG A-3'                      | 95°C 0:45 min<br>64°C 0:30 min<br>72°C 1:30 min<br>Zyklen: 34<br>Zusatz: 10 µl Q-Solu.<br>1 µl Formamid<br>4 µl DMSO<br>5 µl SYBR |
|                                     | <i>reverse (3')</i><br>1:5 verd.  | 5'-ACC AGG GTG GCG ACT CTC CGA A-3'                          |   |
| <b>Aurora-A</b><br><i>real-time</i> | <i>foreward (5')</i><br>1:4 verd. | 5'-AGG CCA CTG AAT AAC AAC CAA AAG-3'                        | 95°C 0:45 min<br>64°C 0:30 min<br>72°C 1:30 min<br>Zyklen: 34<br>Zusatz: 10 µl Q-Solu.<br>1 µl Formamid<br>4 µl DMSO<br>5 µl SYBR |
|                                     | <i>reverse (3')</i><br>1:4 verd.  | 5'-ATG TAC TGA CCA CCC AAA ATC TGC-3'                        |   |
| <b>Aurora-A</b><br><i>Taqman</i>    | <i>foreward (5')</i>              | 5'-GGT GGT CAG TAC ATG CTC CAT CT-3'                         | 95°C 0:15 min<br>62°C 1:00 min<br>Zyklen: 40<br>Zusatz: 1 µl Formamid   |
|                                     | <i>reverse (3')</i>               | 5'-AGC TCC CAG GGC TTT GGT A-3'                              |   |
|                                     | <i>Sonde</i><br><i>X=Tamra</i>    | 5'-6F-ACC AAA CAA CTT CCA CCT CTA AAG TTA CA XT ACCT GG P-3' |   |

|                              |                          |                                      |  |
|------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|--|
|                              |                          |                                      |  |
| <b>WDR3</b><br><i>Taqman</i> | <i>foreward (5`)</i>     | 5`-AGC AGT ACC TAC GCT ATG TTG C-3`  | 95°C 0:15 min<br>60°C 1:30 min<br>Zyklen: 40 |
|                              | <i>reverse (3`)</i>      | 5`-AGG CTC ACC TTC TCT CCT TTC CT-3` |  |
|                              | <i>Sonde</i>             | 5`-TGC GGT CTT TGG CGT TAT CG-3`     |  |
|                              | <i>5`-Tex.Red/ 3`Dab</i> |                                      |  |
|                              |                          |                                      | Zum Abschluss einmalig<br>72°C 7:00 min      |

### 3.7 Amplikon ( Zielsequenz) Design

Die optimale Amplikonlänge für die SYBR Green und Taqman PCR liegt zwischen 75 und 150 Basenpaaren.

### 3.8 Primer Design

#### Geräte

- Computer (PC)
- Software:
  - Pub-med Nucleotid Query
  - Blast (online)
  - Oligo ( Version 6.41)
  - PE/ABD Primer Express software

#### Durchführung:

Aus der im Internet öffentlich zugänglichen NCBI-Datenbank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>), wurden die entsprechenden Basensequenzen der zu untersuchenden DNA- beziehungsweise mRNA/cDNA-Abschnitte entnommen. Anschließend erfolgte online eine genomische Blast-Suche für die jeweiligen mRNA/cDNA-Sequenzen, um das Vorliegen von Pseudogenen zu überprüfen.

Pseudogene sind Bestandteile des Genoms, die durch Mutation aus aktiven Vorläufergenen hervorgegangen sind. Die entstehende Kopie ist stabil, hat jedoch durch Mutation ihre Funktion verloren.

Das Primer Design für die SYBR Green PCR erfolgte anhand dieser Sequenzen mit Hilfe der Software Oligo (Version 6.0). Die Auswahl der passenden Primer und Sonden für die Taqman PCR wurde anhand dieser Sequenzen mit Hilfe der Software Primer Express von PE/ABD durchgeführt. Die Spezifität der so erhaltenen Oligonukleotide für das zu untersuchende Gen wurde anschließend online über eine erneute Blast-Suche (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) überprüft.

Falsch positive Ergebnisse können durch eventuelle DNA-Kontamination der cDNA-Proben generiert werden. Dies kann vermieden werden, wenn die Primer für die mRNA/cDNA-Sequenzen in jeweils unterschiedlichen Exons liegen und ein oder mehrere Introns überspannen.

Durch Beachtung einiger wichtiger Punkte bei der Auswahl der entsprechenden Primer und Sonden können die Optimierungszeiten erheblich verkürzt werden.

### **Primer**

- Die optimale Länge der Primer beträgt 18-25 Basenpaare.
- Der GC-Gehalt sollte zwischen 20 %-70 % betragen.
- Die Primer-Schmelztemperatur sollte zwischen 58 °C und 60 °C liegen.
- Um nicht spezifische Primeranlagerungen zu vermeiden, sollte sich der GC-Gehalt am 3'-Ende, während der letzten 5 Nuklotide auf eins bis zwei GCs beschränken.
- Die Primerkonzentrationen sollten zwischen 50-200 nM im Endsatz sein.
- Um die Ausbildung von Primer-Dimeren zu unterbinden, sollte eine Komplementarität am 3'-Ende zwischen sense und antisense Primer vermieden werden.

### **Sonde**

- Die Sondenkonzentration sollte 100 nM sein.
- Um eine Anlagerung der Sonde vor der Primerverlängerung zu gewährleisten, sollte die Schmelztemperatur der Sonde ungefähr 10 °C größer als die der Primer sein.

- Die optimale Sondenlänge beträgt 30 Basenpaare und der GC-Gehalt sollte um die 50 % liegen.
- Eine Komplementarität der Sonde mit den Primern sollte vermieden werden.
- Um eine Fluoreszenzauslöschung nach dem Abbau der Sonde durch die Polymerase zu vermeiden, sollte sie kein G am 5'-Ende besitzen.
- GC-reiche und repetitive Sequenzen sollten vermieden werden.

### 3.9 Gelelektrophorese der PCR-Produkte und Färbung

-Genexpressionsuntersuchungen mittels SYBR Green real-time PCR-

#### Material

- |                              |  |
|------------------------------|--|
| • 5x TBE-Puffer (Sigma)      | 54g Tris base, 27,5 g Borsäure, 20 ml<br>0,5 M EDTA pH 8,0 mit H <sub>2</sub> O ad 1 L   |
| • Agarose (Biorad)           |  |
| • Ethidiumbromid 1 % (Sigma) |  |
| • DNA-Ladepuffer             | Bromphenolblau (Merck) 0,0625 g<br>Glycerol 87 % (Sigma) 28,7 ml<br>Lauryl-Sulfat (Sigma) 0,25 g<br>EDTA 0,5M (Serva) 5,0 ml<br>Aqua-dist. (Braun) 16,3 ml |
| • DNA-Längenmarker           | Smart-Ladder SF (Eurogentec)   |

#### Methode

Die amplifizierten Produkte wurden über eine Gelelektrophorese hinsichtlich ihrer Größe charakterisiert. In Abhängigkeit der zu erwartenden DNA, beziehungsweise cDNA-Größe, wurden 1-3%ige Agarose-Gele verwendet. Es entstanden Gele mit verschiedener Porengröße, durch die die negativ geladene Nukleinsäure nach Anlegen einer Spannung im Laufpuffer zum positiven Pol wanderte.

Der 5x TBE-Puffer wurde im Verhältnis 1:5 mit Aqua-dist. verdünnt. Für ein 2%iges Gel wurde 1 g der Agarose mit 50 ml 1x TBE-Puffer angesetzt und bis zur vollständigen Lösung aufgekocht. Nach Abkühlen auf circa 40 °C wurde die Agaroselösung in ein vorbereitetes Gelkammersystem gegossen, wo es nach Erkalten zu einem Gel aushärtete. Anschließend wurden die Gele in eine mit 1x TBE-Puffer gefüllte Laufkammer gelegt. Die Proben wurden mit 5 µl DNA-Ladepuffer versetzt.



Jeweils 20 µl des PCR-Produkt Ansatzes und 4 µl des DNA-Längenmarkers wurden in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 90 V für circa 75 Minuten. Nach der Auftrennung wurde das Gel mit dem fluoreszierenden Farbstoff Ethidiumbromid, der spezifisch an DNA bindet, für 15 Minuten inkubiert und anschließend 15 Minuten in H<sub>2</sub>O gewaschen. Die PCR-Fragmente wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem computergesteuerten Kamerasystem und der zugehörigen Software (Image Master (Pharmacia Biotec)) digital aufgenommen und gespeichert.

### **3.10 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Färbung**

-Genomische Amplifikationsuntersuchung mittels Taqman PCR-

#### **Material**

- 10x TBE-Puffer (Sigma)
- 29:1 (w/w) Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (AppliChem)
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) (GibcoBRL)
- 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat (Sigma)
- DNA-Ladepuffer (Zusammensetzung , wie im Abschnitt 3.9 beschrieben)
- DNA-Längenmarker ( 1kb DNA-Ladder 1µg/µl (GibcoBRL)
- Aqua-dist. (Braun)
- Ethidiumbromid 0.5 µg/ml (Sigma)

#### **Methode**

Mit der Polyacrylamid-Gelelektrophorese besteht die Möglichkeit kleine DNA-Fragmente (<1000bp) aufzutrennen. Für ein 15%iges Gel wurden 5 ml 10x TBE-Puffer, 25 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung auf ein Volumen von 50 ml mit Aqua-dist. aufgefüllt. Um die Polymerisationsreaktion zu starten wurde dieses Gemisch für drei Minuten unter Vakuum durchmischt. Nach Zugabe von 50 µl TEMED und 500 µl Ammoniumpersulfat wurde die Lösung nochmals durchmischt. Anschließend wurde die Gellösung zwischen Glasscheiben der Größe 20 cm x 20 cm x 1,6 mm gegossen, die zuvor an drei Seiten mit Schienen abgedichtet worden war. Nach Einsetzen eines Kammes wurden Probenladetaschen erzeugt und die Gellösung für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur zwischen den Glasscheiben zur Polymerisation belassen.

Nach der Polymerisation wurden die untere Schiene und der Kamm entfernt und die entstandenen Ladetaschen mit Aqua-dest. ausgespült. Anschließend wurden die Glasscheiben in eine Elektrophoreseapparatur überführt und die obere Pufferkammer mit 1x TBE-Puffer aufgefüllt bis die Ladetaschen überschichtet waren. Die sich zeigenden Luftblasen wurden mit einer Spritze entfernt. Die Proben wurden mit 10 µl Ladepuffer versetzt. Jeweils 20 µl des PCR-Produkt Ansatzes und 10 µl des DNA-Längenmarkers wurden mit einer Hamiltonpipette in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 5 V/cm. Nach der Auftrennung wurde das Gel für 30 Minuten in Ethidiumbromid inkubiert und anschließend 30 Minuten in H<sub>2</sub>O gewaschen. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden im UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer Videokamera photographiert (Image Master, Pharmacia Biotec).

### **3.11 Statistische Verfahren**

Der Vergleich zweier unabhängiger Stichproben auf Lageunterschiede wurde mit Hilfe des Mann-Whitney U-Test berechnet. Es wurde ein p-Wert kleiner 0,05 als statistisch signifikant gewertet. Die Korrelation zwischen zwei Variablen X und Y wurde mit einem Streudiagramm veranschaulicht. Die Stärke der Beziehung wurde mit einem Korrelationskoeffizienten quantifiziert. Von einem deutlichen linearen Trend spricht man ab einem Korrelationskoeffizienten von  $< -0,7$  ( $> 0,7$ ).

Die Auswertung der Aurora-A Amplifikationsanalyse mit dem Taqman Verfahren wurde mit Hilfe der Normalverteilung ausgewertet. Es wurden die Schranken für das 99 % Konfidenzintervall ausgerechnet und alle Werte kleiner als diese Grenze wurden als signifikant erachtet.

## **Ergebnisse**

### **4.1 Validierung der Microarray-Genexpressionsdaten mittels SYBR Green PCR**

Mit der Microarray-Technologie kann die Genexpression vieler Gene gleichzeitig bestimmt werden. So sind Aussagen über den Beitrag der Gene zur Tumorentstehung potentiell möglich.

Mit Hilfe des Microarray-Verfahrens wurden die Genexpressionsmuster von 94 Neuroblastomproben mit einem 4608 Genfragmente enthaltenden Microarray-Chip untersucht.

Die Tumorproben wurden aus einer 1378 Neuroblastome enthaltenden Tumorbank ausgewählt. Diese stellen hinsichtlich der Stadien- und Altersverteilung eine annähernd repräsentative Auswahl der Gesamtpopulation aller Neuroblastome der Bundesrepublik Deutschland dar. Unter diesen Proben befanden sich 77 MYCN nicht amplifizierte und 17 MYCN amplifizierte Neuroblastomproben. Es wurden 123 differentiell exprimierte Gene gefunden, darunter waren sowohl bekannte als auch neue, in der Literatur bisher nicht vorbeschriebene N-Myc regulierte Gene. Aus den erfassten, differentiell exprimierten Genen wurden 5 Gene an 10 MYCN amplifizierten und 12 MYCN nicht amplifizierten Tumorproben unter Verwendung der quantitativen real-time PCR untersucht.

| <b>Gen Name</b> | <b>Accession Nr.</b> | <b>Regulation in MYCN amp. Tumoren</b> |
|-----------------|----------------------|--|
| MYCN            | R66447               | hochreguliert                          |
| Aurora-A        | R19158               | hochreguliert                          |
| TRAP1           | AA497020             | hochreguliert                          |
| EFNB3           | AA485665             | herunterreguliert                      |
| SOCS            | N57723               | herunterreguliert                      |

**Tab. 4.1**

Accession Nr. der NCBI-Datenbank.

#### **4.1.1 Standardisierung der cDNA-Konzentrationen mit Hilfe der Real-Time $\beta$ -actin**

##### **PCR**

Die mRNA Transkriptionsmuster zwischen verschiedenen Proben oder Geweben müssen zuerst anhand einer internen Kontrolle (Referenzgen/Housekeeping-Gene) standardisiert werden, um die erhaltenen  $C_t$ -Werte miteinander vergleichen zu können (Radonic et al., 2003). Der  $C_t$ -Wert ist der erste Zyklus der quantitativen real-time PCR, dessen Fluoreszenzsignal sich signifikant vom Hintergrundsignal unterscheidet. Dabei verhält sich der  $C_t$ -Wert umgekehrt proportional zum Logarithmus der Ausgangsmenge an Nukleinsäure (Higuchi et al., 1993). Je kleiner der  $C_t$ -Wert ist, desto größer ist die Kopie der Zielsequenz vor dem Reaktionslauf.

Als Referenz sollten Gene verwendet werden, die ubiquitär vorkommen und auf konstantem Level zwischen verschiedenen Geweben einer Spezies exprimiert werden. Zudem ist es wichtig, dass die Expression unter verschiedenen experimentellen Bedingungen konstant bleibt (Bustin, 2000). Durch die Auswahl des geeigneten Referenzgens können Fehler, die auf gering veränderten PCR-Effektivitäten oder verschiedenen Ausgangskonzentrationen basieren normalisiert werden (Radonic et al., 2004).

Im Jahre 1999 wurden über 90 % der durchgeführten RNA Transkriptionsuntersuchungen unter Verwendung eines Referenzgens, wie  $\beta$ -actin, GAPDH, 18S und 28S rRNA vollzogen (Suzuki et al., 2000).

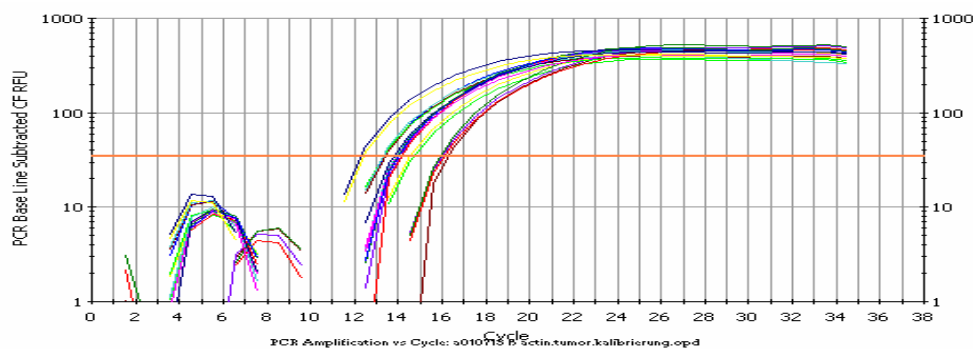
In dieser Arbeit wurden zur Standardisierung der untersuchten Gene die  $\beta$ -actin cDNA verwendet. Die  $\beta$ -actin Expression erfolgt in den meisten Zellen auf einem mittelmäßigen Niveau und kodiert für ein ubiquitäres Zytoskelettprotein. Die zytoplasmatische  $\beta$ -actin RNA ist sehr gut untersucht und kann in allen humanen Geweben zur Standardisierung herangezogen werden. Publierte Daten veranschaulichen, dass  $\beta$ -actin nur minimale intraindividuelle Unterschiede im Expressionsmuster zeigt und primär nicht unter dem Einfluss pathologischer Prozesse steht (Kreutzer et al., 1999).

An vier verschiedenen Tagen wurden vier Versuche unter denselben Bedingungen durchgeführt, um das  $\beta$ -actin Expressionsprofil von 10 MYCN amplifizierten und 12 MYCN nicht amplifizierten Neuroblastomproben zu ermitteln (Fig.4.1.1). Aus diesen Daten wurden die Mittelwerte errechnet und als Säulendiagramm dargestellt (Fig.4.1.1). Um die Koamplifikation von weiteren, für die ausgewählten Primersequenzen nicht spezifischen cDNA-Abschnitten zu kontrollieren, erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der erhaltenen PCR Produkte im Agarosegel (Fig.4.1.1). Anhand des Mann-Whitney U-Tests

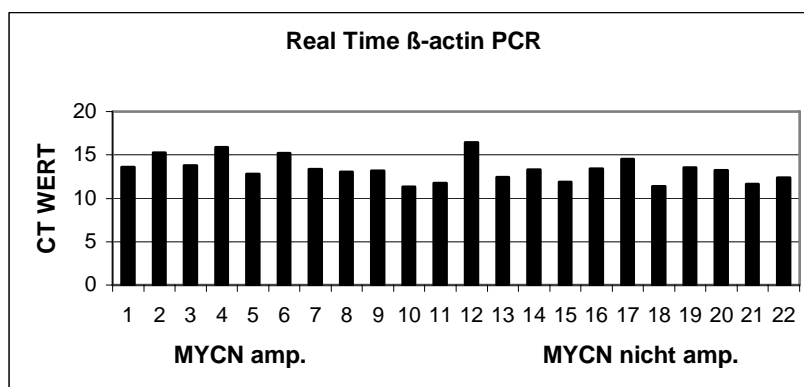
konnte gezeigt werden, dass die Unterschiede in den erhobenen Mittelwerten innerhalb der beiden Gruppen (MYCN amplifiziert vs. MYCN nicht amplifiziert) nicht signifikant sind ( $p=0,082$ ).

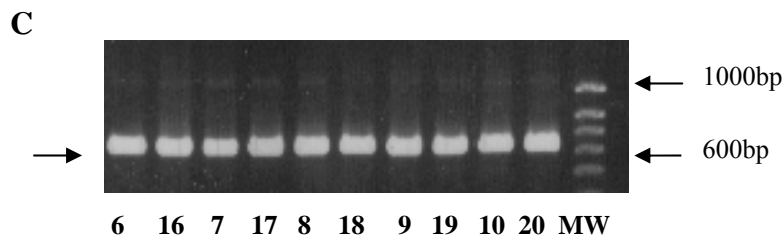
Die erhaltenen  $C_t$ -Werte des zu untersuchenden Gens wurden anhand der  $\beta$ -actin Expressionsdaten normalisiert, indem die Differenz gebildet wurde (Diff.  $\Delta$  = MW Gen - MW  $\beta$ -actin).

**A**



**B**





**Figur 4.1.1.** Real time  $\beta$ -actin PCR zur Standardisierung der cDNA Konzentrationen.

(A) Repräsentative Darstellung der  $\beta$ -actin Amplifikationskurven. Auf der x-Achse sind die PCR Zyklen und auf der y-Achse die Intensität des Signals logarithmisch aufgetragen. Die waagerechte Linie schneidet die Kurven im steilsten Bereich und bestimmt die  $C_t$ -Werte.

(B) Graphische Darstellung der ermittelten Mittelwerte als Säulendiagramm. Auf der x-Achse sind die Tumorproben (1-10 MYCN amplifiziert, 11-22 MYCN nicht amplifiziert) und auf der y-Achse der  $C_t$ -Wert aufgetragen.

(C) Agarosegelbild nach elektrophoretischer Auftrennung der  $\beta$ -actin PCR Produkte. Der Pfeil auf der linken Seite zeigt die Höhe des erwarteten PCR-Produktes an. MW: Molekulargewichtsmarker. MYCN amplifizierte Proben (6-7-8-9-10), MYCN nicht amplifizierte Proben (16-17-18-19-20).

#### 4.1.2 Validierung der MYCN Genexpressionsdaten

In der Literatur ist beschrieben, dass MYCN amplifizierte Neuroblastome das MYCN auf einem höheren Level exprimieren, als MYCN nicht amplifizierte Neuroblastome (Nakagawara et al., 1992).

An zwei verschiedenen Tagen wurden zwei Versuche unter denselben Bedingungen durchgeführt, um das MYCN Expressionsprofil von 8 MYCN amplifizierten und 10 MYCN nicht amplifizierten Neuroblastomproben mittels quantitativer real-time PCR (SYBR Green) zu ermitteln (Fig.4.1.2).

Die  $\beta$ -actin normalisierten Expressionsdaten wurden als Säulendiagramm dargestellt (Fig.4.1.2). Ferner erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der erhaltenen PCR Produkte im Agarosegel (Fig.4.1.2). Mit Hilfe des Mann-Whitney U-Test konnte gezeigt werden, dass sich die  $\beta$ -actin standardisierten Werte, zwischen den beiden Gruppen (MYCN amplifiziert vs. MYCN nicht amplifiziert) signifikant unterscheiden ( $p=0,000$ ). Die MYCN amplifizierten Tumorproben haben kleinere  $C_t$ -Werte als die MYCN nicht amplifizierten.

Die zu validierenden Microarray-Genexpressionsdaten sind aus Berwanger et al. entnommen (Berwanger et al., 2002). Die Microarray-Genexpressionsmuster, errechnet aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten zwischen Standard-RNA und Tumor-RNA (Ratio), sind als Säulendiagramm dargestellt (Fig.4.1.2).

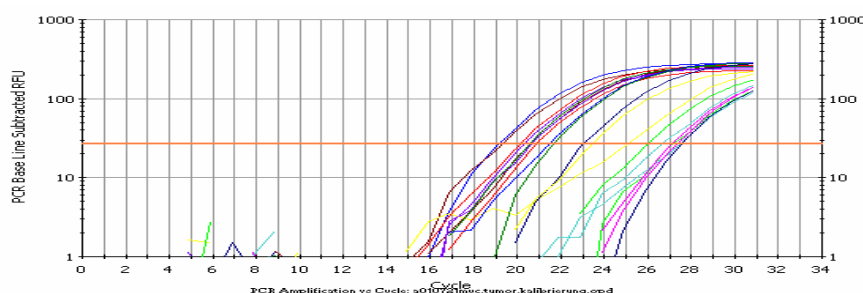
Die real-time Ergebnisse korrelieren mit den Microarray-Ergebnissen, da wie aus

Figur 4.1.2.D ersichtlich, im Microarray-Experiment in den MYCN amplifizierten Tumorproben, das MYCN auf einem höheren Level als in den MYCN nicht amplifizierten Tumorproben exprimiert wird. Die Korrelation zwischen den Microarray- und real-time PCR Genexpressionsdaten wurde mit Hilfe eines Streudiagramms (Scatterplot) graphisch dargestellt (Fig.4.1.2).

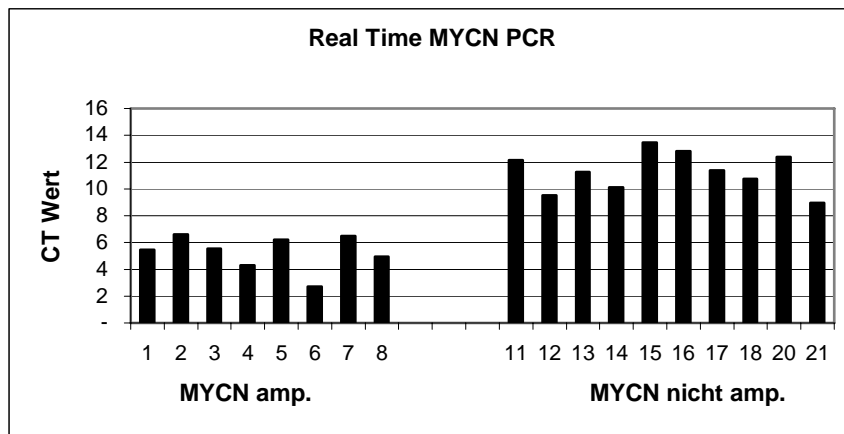
Der Scatterplot veranschaulicht eine Beziehung zwischen zwei Variablen X und Y. Die Stärke der Beziehung wurde mit einem Korrelationskoeffizienten quantifiziert ( $r = -0,69$ ). Je enger die Beziehung zwischen den beiden Variablen ist, desto näher liegt der Betrag des Koeffizienten  $r$  an  $\pm 1$ . Je schwächer die Beziehung ist, desto näher liegt  $r$  an 0. Das Vorzeichen von  $r$  zeigt, welche Richtung diese Assoziation hat:  $r = +1$ , wenn die beiden Variablen miteinander größer werden,  $r = -1$ , wenn eine Variable kleiner wird, während die andere größer wird.

Der Scatterplot zeigt anschaulich, dass zwischen den Microarray- und real-time PCR MYCN Genexpressionsmuster nahezu ein bedeutender Zusammenhang besteht. Das heißt je größer die Ratio, desto kleiner ist der  $C_t$ -Wert, ein Maß für die Kopie der Zielsequenz vor dem Reaktionslauf. Von einem deutlichen linearen Trend spricht man ab einem Korrelationskoeffizienten von  $< -0,7$  ( $>0,7$ ). Im vorliegenden Fall besteht eine negative lineare Beziehung zwischen den Variablen. Die Werte streuen nur wenig um die berechnete Regressionsgerade mit der Steigung  $a = -0,5128$  ( $y = ax + b$ ).

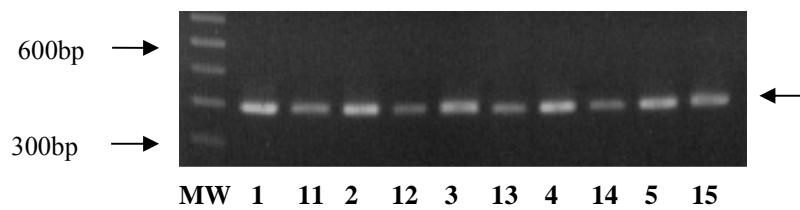
**A**



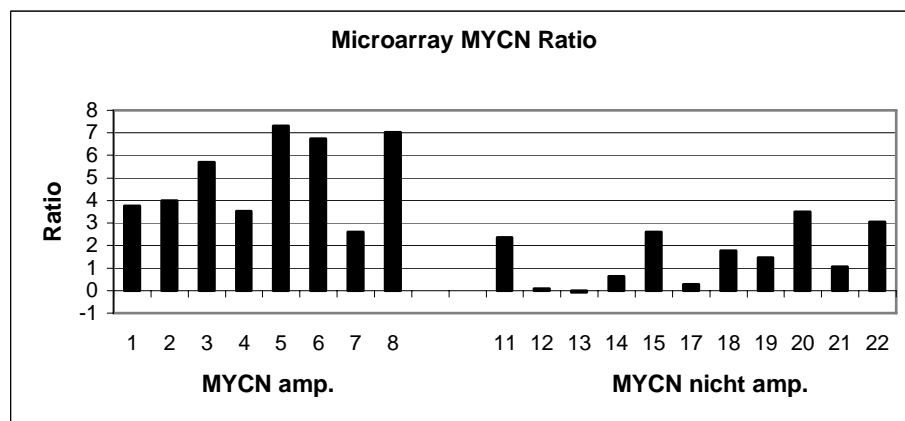
**B**



**C**

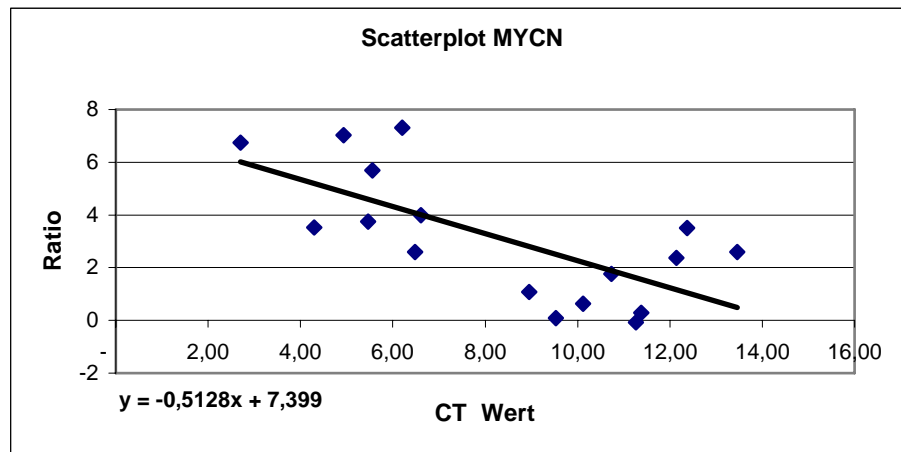


**D**





## E



Korrelationskoeffizient  $r = -0,69$

**Figur 4.1.2** Validierung der MYCN Genexpressionsdaten.

(A) Repräsentative Darstellung der MYCN Amplifikationskurven. Auf der x-Achse sind die PCR Zyklen und auf der y-Achse das Fluoreszenzsignal logarithmisch aufgetragen. Die waagerechte Linie schneidet die Kurven im steilsten Bereich und bestimmt die  $C_T$ -Werte. Der  $C_T$ -Wert ist der erste Zyklus der quantitativen real-time PCR, dessen Fluoreszenzsignal sich signifikant vom Hintergrundsignal unterscheidet. Dabei verhält sich der  $C_T$ -Wert umgekehrt proportional zum Logarithmus der Ausgangsmenge an Nukleinsäure.

(B) Graphische Darstellung der  $\beta$ -actin standardisierten MYCN Genexpressionsdaten als Säulendiagramm. Auf der x-Achse sind die Tumorproben (1-8 MYCN amplifiziert, 11-21 MYCN nicht amplifiziert) auf der y-Achse der  $C_T$ -Wert aufgetragen. Die Unterschiede sind statistisch signifikant ( $p=0,000$ , Mann-Whitney U-Test).

(C) Agarosegelbild nach elektrophoretischer Auftrennung der MYCN PCR Produkte. Der Pfeil auf der rechten Seite zeigt die Höhe des erwarteten PCR-Produktes an.

MW: Molekulargewichtsmarker. MYCN amplifizierte Proben (1-2-3-4-5), MYCN nicht amplifizierte Proben (11-12-13-14-15).

(D) Microarray MYCN Genexpressionsdaten als Säulendiagramm. Auf der x-Achse sind die Tumorproben und auf der y-Achse die Ratio aufgetragen. Die Ratio ist ein Maß für die relative Genexpressionsaktivität errechnet aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten zwischen Standard-RNA (SHEP) und Tumor-RNA.

(E) Auf der x-Achse sind die  $C_T$ -Werte aus den real-time PCR Experimenten und auf der y-Achse die Ratio aus den Microarray-Experimenten aufgetragen. Die Korrelation zwischen den Microarray- und real-time PCR Expressionsdaten wurde mit einem Streudiagramm (Scatterplot) mit Regressionsgeraden ( $y = -0,5128x + 7,399$ ) graphisch dargestellt und einem Korrelationskoeffizienten  $r = -0,69$  quantifiziert.

### 4.1.3 Validierung der Aurora-A Genexpressionsdaten

In der Literatur wird Aurora-A eine wichtige Rolle in der Transformation von Säugetierzellen zugeschrieben. Aurora-A kodiert für eine Zentrosomen-assoziierten Kinase, deren Überexpression zu Zentrosomen-Amplifikation und Chromosomeninstabilität führt (Zhou et al., 1998).

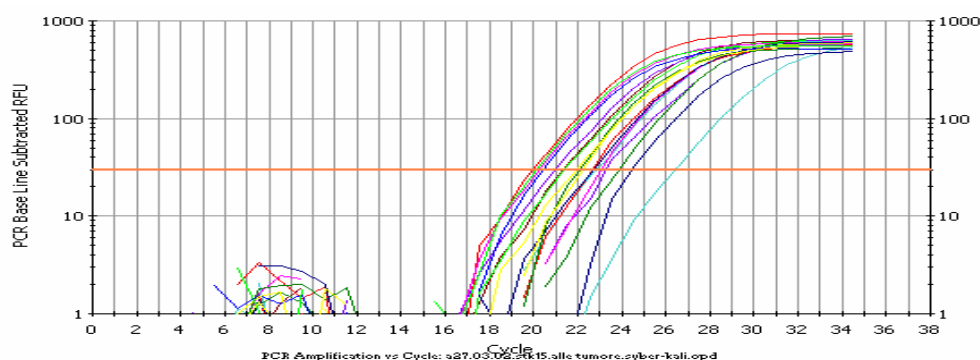
An zwei verschiedenen Tagen wurden zwei Versuche unter denselben Bedingungen durchgeführt, um das Aurora-A Expressionsprofil von 8 MYCN amplifizierten und 10

MYCN nicht amplifizierten Neuroblastomproben mittels quantitativer real-time PCR (SYBR Green) zu ermitteln (Fig.4.1.3).

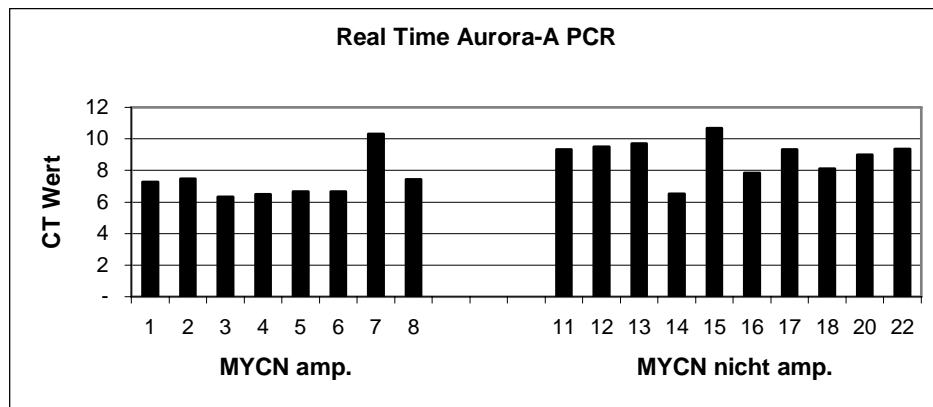
Die  $\beta$ -actin normalisierten Expressionsdaten wurden als Säulendiagramm dargestellt (Fig.4.1.3). Ferner erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der erhaltenen PCR Produkte im Agarosegel (Fig.4.1.3). Mit Hilfe des Mann-Whitney U-Test konnte gezeigt werden, dass sich die  $\beta$ -actin standardisierten Werte, zwischen den beiden Gruppen (MYCN amplifiziert vs. MYCN nicht amplifiziert) signifikant unterscheiden ( $p=0,021$ ). Die MYCN amplifizierten Tumorproben haben kleinere  $C_t$ -Werte als die MYCN nicht amplifizierten. In beiden Gruppen gibt es jeweils einen Ausreißer, Tumorprobe Nr. 7 und Nr. 14.

Die Aurora-A Microarray-Genexpressionsmuster, erstellt aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten zwischen Standard-RNA und Tumor-RNA (Ratio) sind als Säulendiagramm dargestellt (Fig.4.1.3). Die real-time Ergebnisse korrelieren mit den Microarray-Ergebnissen, da wie aus Figur 4.1.3.D ersichtlich, im Microarray-Experiment, in den MYCN amplifizierten Tumorproben, das Aurora-A Gen auf einem höheren Level, als in den MYCN nicht amplifizierten Tumorproben exprimiert wird. Die Korrelation zwischen den Microarray- und real-time PCR Genexpressionsdaten wurde mit Hilfe eines Streudiagramms (Scatterplot) graphisch dargestellt (Fig.4.1.3). Die Stärke der Beziehung wurde mit Hilfe eines Korrelationskoeffizienten quantifiziert ( $r = -0,69$ ). Der Scatterplot zeigt anschaulich, dass zwischen den Microarray- und real-time PCR MYCN Genexpressionsmuster nahezu ein bedeutender Zusammenhang besteht. Von einem deutlichen linearen Trend spricht man ab einem Korrelationskoeffizienten von  $< -0,7$  ( $> 0,7$ ). Im vorliegenden Fall besteht eine negative lineare Beziehung zwischen den Variablen. Die Werte streuen nur wenig um die berechnete Regressionsgerade mit der Steigung  $a = -0,3356$  ( $y = ax + b$ ).

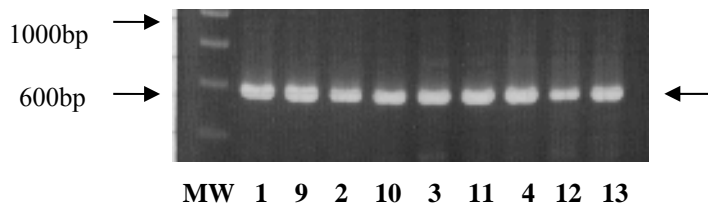
A



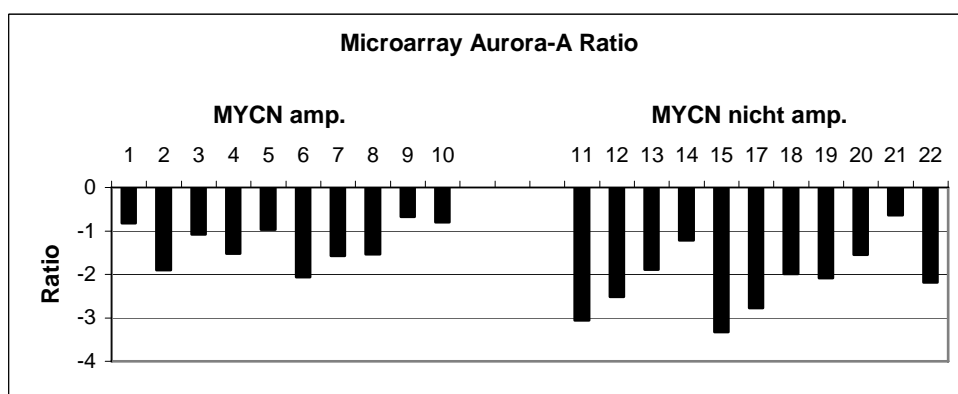
**B**



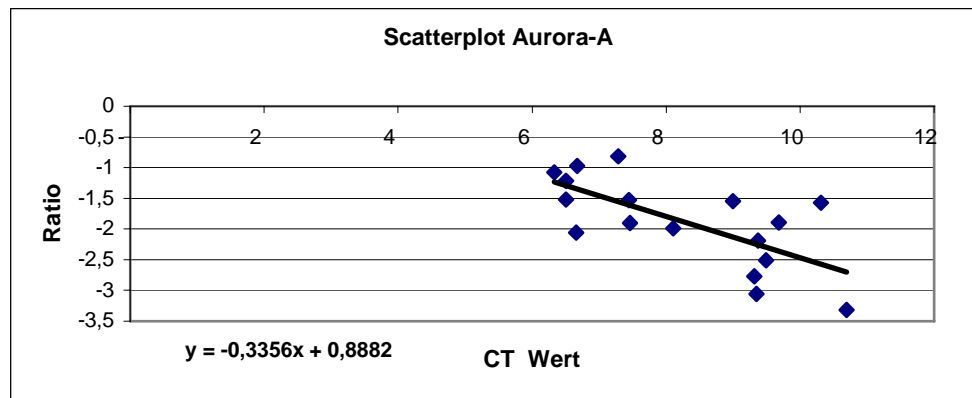
**C**



**D**



## E



Korrelationskoeffizient  $r = -0,69$

**Figur 4.1.3** Validierung der Aurora-A Genexpressionsdaten (zur ausführlichen Beschreibung siehe Figur 4.1.2).  
 (A) Repräsentative Darstellung der Aurora-A Amplifikationskurven. Auf der x-Achse sind die PCR Zyklen und auf der y-Achse das Fluoreszenzsignal logarithmisch aufgetragen. Die waagerechte Linie schneidet die Kurven im steilsten Bereich und bestimmt die  $C_T$ -Werte.  
 (B) Graphische Darstellung der  $\beta$ -actin standardisierten Aurora-A Genexpressionsdaten als Säulendiagramm. Auf der x-Achse sind die Tumorproben (1-8 MYCN amplifiziert, 11-22 MYCN nicht amplifiziert) auf der y-Achse der  $C_T$ -Wert aufgetragen. Die Unterschiede sind statistisch signifikant ( $p=0,021$ , Mann-Whitney U-Test).  
 (C) Agarosegelbild nach elektrophoretischer Auftrennung der Aurora-A PCR Produkte. Der Pfeil auf der rechten Seite zeigt die Höhe des erwarteten PCR-Produktes an.  
 MW: Molekulargewichtsmarker. MYCN amplifizierte Proben (1-2-3-4), MYCN nicht amplifizierte Proben (9-10-11-12-13).  
 (D) Microarray Aurora-A Genexpressionsdaten als Säulendiagramm. Ratio: Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten zwischen Standard-RNA (SHEP) und Tumor-RNA.  
 E) Streudiagramm (Scatterplot) mit Regressionsgeraden ( $y = -0,3356x + 0,8882$ ) und Korrelationskoeffizienten  $r = -0,69$ .

### 4.1.4. Validierung der TRAP1 Genexpressionsdaten

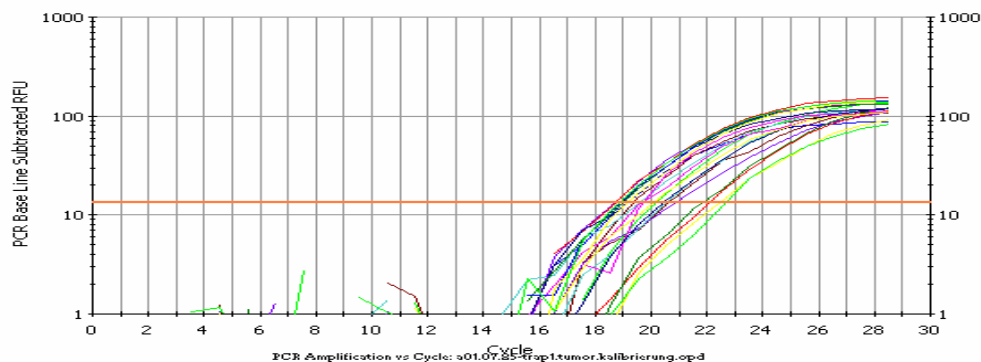
TRAP1 kodiert für ein Tumornekrosefaktorrezeptor assoziiertes Protein und ist bereits eines der bekanntesten Zielgene von N-Myc.

Ein möglicher Mechanismus der MYCN induzierten Apoptose wird über TRAP1 vermittelt (Song et al., 1995; Coller et al., 2000).

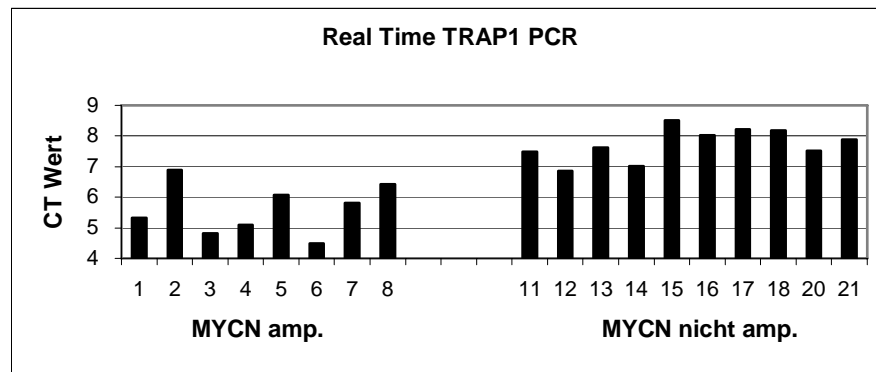
An zwei verschiedenen Tagen wurden zwei Versuche unter denselben Bedingungen durchgeführt, um das TRAP1 Expressionsprofil von 8 MYCN amplifizierten und 10 MYCN nicht amplifizierten Neuroblastomproben mittels quantitativer real-time PCR (SYBR Green) zu ermitteln (Fig.4.1.4). Die  $\beta$ -actin normalisierten Expressionsdaten wurden als Säulendiagramm dargestellt (Fig.4.1.4). Ferner erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der erhaltenen PCR Produkte im Agarosegel (Fig.4.1.4). Mit Hilfe des Mann-Whitney U-Test

konnte gezeigt werden, dass sich die  $\beta$ -actin standardisierten Werte, zwischen den beiden Gruppen (MYCN amplifiziert vs. MYCN nicht amplifiziert) signifikant unterscheiden ( $p=0,000$ ). Die MYCN amplifizierten Tumorproben haben kleinere  $C_t$  Werte als die MYCN nicht amplifizierten. Die TRAP1 Microarray-Genexpressionsmuster, erstellt aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten zwischen Standard-RNA und Tumor-RNA (Ratio), sind als Säulendiagramm dargestellt (Fig.4.1.4). Die real-time Ergebnisse korrelieren mit den Microarray-Ergebnissen, da wie aus Figur 4.1.4.D ersichtlich, im Microarray-Experiment in den MYCN amplifizierten Tumorproben, das TRAP1 Gen auf einem höheren Level, als in den MYCN nicht amplifizierten Tumorproben exprimiert wird. Die Korrelation zwischen den Microarray- und real-time PCR Genexpressionsdaten wurde mit Hilfe eines Streudiagramms (Scatterplot) graphisch dargestellt (Fig.4.1.4). Die Stärke der Beziehung wurde mit einem Korrelationskoeffizienten quantifiziert ( $r = -0,79$ ). Der Scatterplot zeigt anschaulich, dass zwischen den Microarray- und real-time PCR TRAP1 Genexpressionsmuster ein bedeutender Zusammenhang besteht. Von einem deutlichen linearen Trend spricht man ab einem Korrelationskoeffizienten von  $< -0,7$  ( $>0,7$ ). Im vorliegenden Fall besteht eine negative lineare Beziehung zwischen den Variablen. Die Werte streuen nur wenig um die berechnete Regressionsgerade mit der Steigung  $a = -0,4183$  ( $y = ax + b$ ).

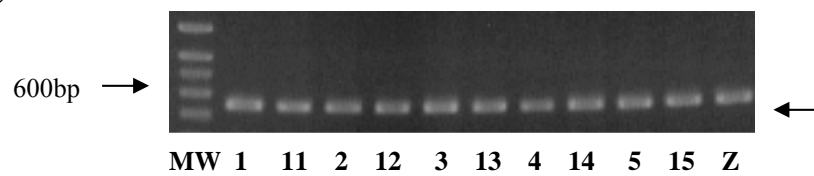
**A**



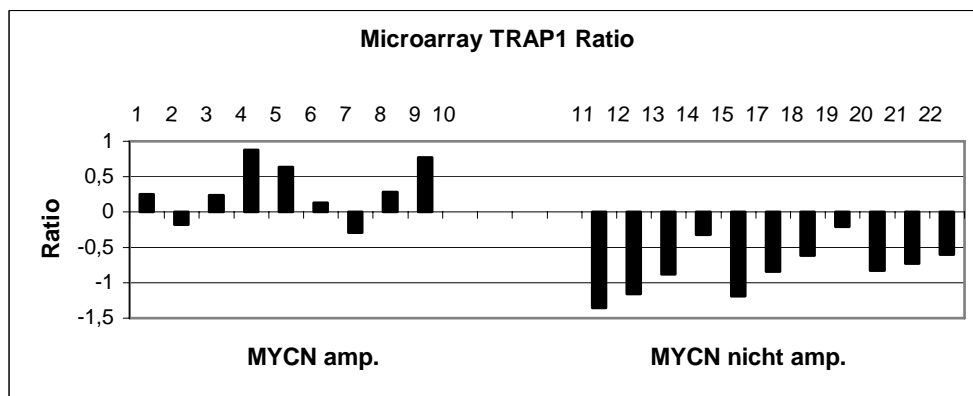
**B**



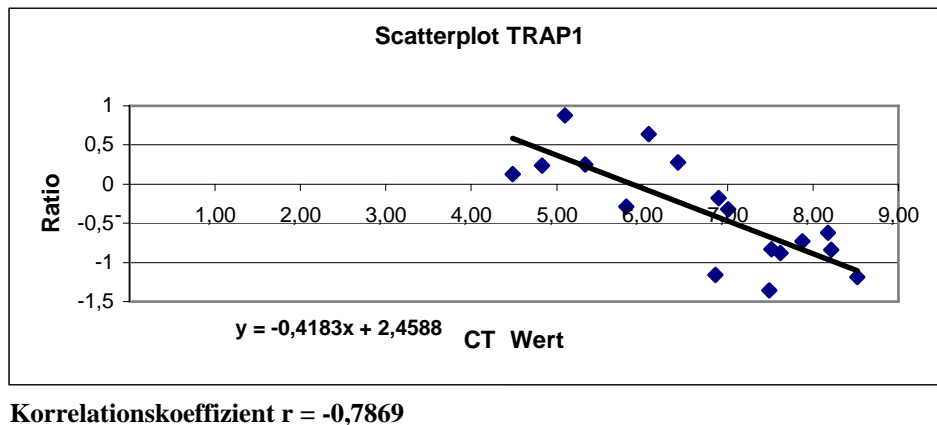
**C**



**D**



**E**



**Figur 4.1.4** Validierung der TRAP1 Genexpressionsdaten (zur ausführlichen Beschreibung siehe Figur 4.1.2).

(A) Repräsentative Darstellung der TRAP1 Amplifikationskurven. Auf der x-Achse sind die PCR Zyklen und auf der y-Achse das Fluoreszenzsignal logarithmisch aufgetragen. Die waagerechte Linie schneidet die Kurven im steilsten Bereich und bestimmt die  $C_t$ -Werte.

(B) Graphische Darstellung der  $\beta$ -actin standardisierten TRAP1 Genexpressionsdaten als Säulendiagramm. Auf der x-Achse sind die Tumorproben (1-8 MYCN amplifiziert, 11-21 MYCN nicht amplifiziert) auf der y-Achse der  $C_t$ -Wert aufgetragen. Die Unterschiede sind statistisch signifikant ( $p=0,000$ , Mann-Whitney U-Test).

(C) Agarosegelbild nach elektrophoretischer Auftrennung der TRAP1 PCR Produkte. Der Pfeil auf der rechten Seite zeigt die Höhe des erwarteten PCR-Produktes an.

MW: Molekulargewichtsmarker. MYCN amplifizierte Proben (1-2-3-4-5), MYCN nicht amplifizierte Proben (11-12-13-14-15), Z= SHEP-Zelllinie.

(D) Microarray TRAP1 Genexpressionsdaten als Säulendiagramm. Ratio: Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten zwischen Standard-RNA (SHEP) und Tumor-RNA.

(E) Streudiagramm (Scatterplot) mit Regressionsgeraden ( $y = -0,4183x + 2,4588$ ) und Korrelationskoeffizienten  $r = -0,7869$ .

#### 4.1.5 Validierung der EFNB3 Genexpressionsdaten

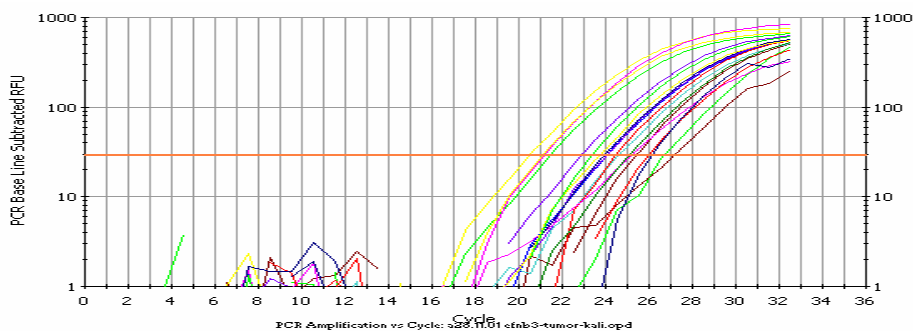
Es ist bekannt, dass EFNB3 in MYCN amplifizierten Neuroblastomen auf einem niedrigeren Niveau exprimiert wird als in MYCN nicht amplifizierten. Ferner ist die Überexpression von EFNB3 mit günstigen Tumorstadien (1, 2 und 4S) und hoher TrkA Koexpression korreliert (Tang et al., 2000; Tang et al., 1999).

An zwei verschiedenen Tagen wurden zwei Versuche unter denselben Bedingungen durchgeführt um das EFNB3 Expressionsprofil von 8 MYCN amplifizierten und 11 MYCN nicht amplifizierten Neuroblastomproben mittels quantitativer real-time PCR zu ermitteln (SYBR Green) (Fig.4.1.5). Die  $\beta$ -actin normalisierten Expressionsdaten wurden als Säulendiagramm dargestellt (Fig.4.1.5). Ferner erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der erhaltenen PCR Produkte im Agarosegel (Fig.4.1.5). Mit Hilfe des Mann-Whitney U-Test konnte gezeigt werden, dass sich die  $\beta$ -actin standardisierten Werte, zwischen den beiden

Gruppen (MYCN amplifiziert vs. MYCN nicht amplifiziert) nicht signifikant unterscheiden ( $p=0,351$ ).

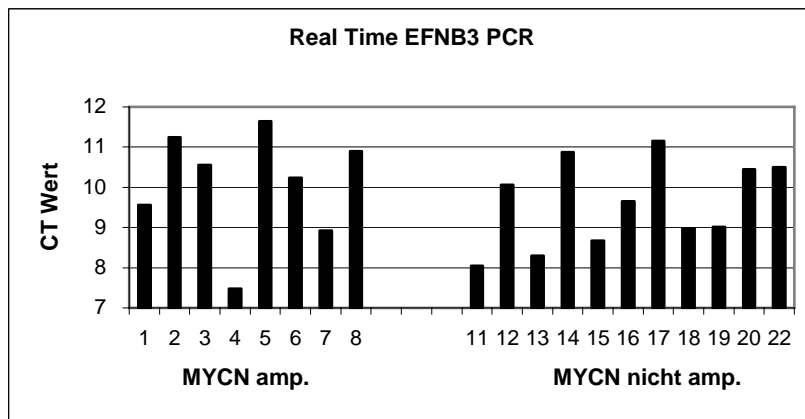
Die EFNB3 Microarray-Genexpressionsmuster, erstellt aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten zwischen Standard-RNA und Tumor-RNA (Ratio), sind als Säulendiagramm dargestellt (Fig.4.1.5). Im Microarray-Experiment wurde beobachtet, wie bereits in der Literatur vorbeschrieben, dass die EFNB3 Expression in MYCN nicht amplifizierten Tumorproben stärker ist als in der Gruppe der MYCN amplifizierten Tumorproben. Die Korrelation zwischen den Microarray- und real-time PCR Genexpressionsdaten wurde mit Hilfe eines Streudiagramms (Scatterplot) graphisch dargestellt (Fig.4.1.5). Die Stärke der Beziehung wurde mit einem Korrelationskoeffizienten quantifiziert ( $r = -0,33$ ). Das Streudiagramm zeigt anschaulich, dass zwischen den Microarray- und real-time PCR EFNB3 Genexpressionsmuster ein schwacher Zusammenhang besteht. Von einem deutlichen linearen Trend spricht man ab einem Korrelationskoeffizienten von  $< -0,7$  ( $>0,7$ ). Im vorliegenden Fall besteht eine schwache negative lineare Beziehung zwischen den Variablen. Die Werte streuen stark um die berechnete Regressionsgerade mit der Steigung  $a = -0,1988$  ( $y = ax + b$ ).

**A**

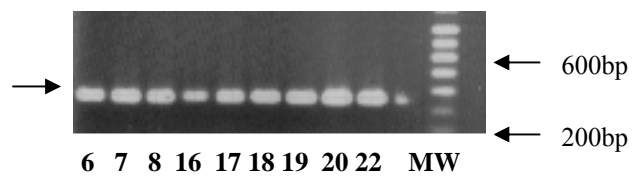




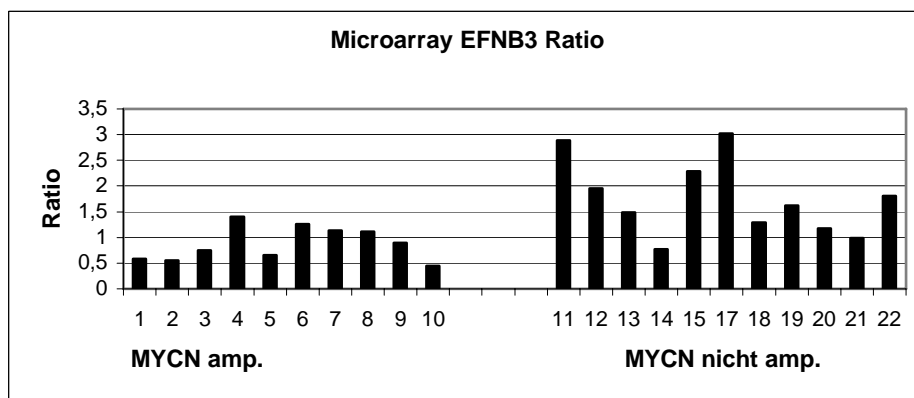
**B**



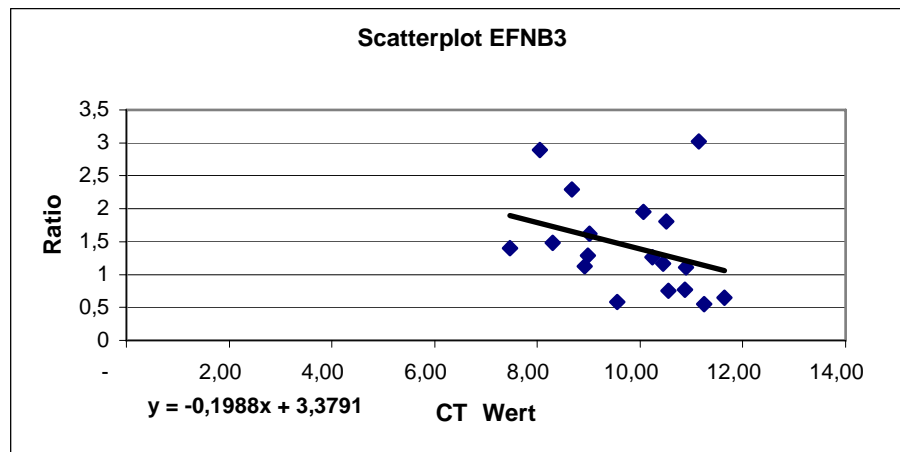
**C**



**D**



## E



Korrelationskoeffizient  $r = -0,33$

**Figur 4.1.5** Validierung der EFNB3 Genexpressionsdaten (zur ausführlichen Beschreibung siehe Figur 4.1.2).

(A) Repräsentative Darstellung der EFNB3 Amplifikationskurven. Auf der x-Achse sind die PCR Zyklen und auf der y-Achse das Fluoreszenzsignal logarithmisch aufgetragen. Die waagerechte Linie schneidet die Kurven im steilsten Bereich und bestimmt die  $C_T$ -Werte.

(B) Graphische Darstellung der  $\beta$ -actin standardisierten EFNB3 Genexpressionsdaten als Säulendiagramm. Auf der x-Achse sind die Tumorproben (1-8 MYCN amplifiziert, 11-22 MYCN nicht amplifiziert) auf der y-Achse der  $C_T$ -Wert aufgetragen. Die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant ( $p=0,351$ , Mann-Whitney U-Test).

(C) Agarosegelbild nach elektrophoretischer Auftrennung der EFNB3 PCR Produkte. Der Pfeil auf der linken Seite zeigt die Höhe des erwarteten PCR-Produktes an.

MW: Molekulargewichtsmarker. MYCN amplifizierte Proben (6-7-8), MYCN nicht amplifizierte Proben (16-17-18-19-20-22).

(D) Microarray EFNB3 Genexpressionsdaten als Säulendiagramm. Ratio: Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten zwischen Standard-RNA (SHEP) und Tumor-RNA

(E) Streudiagramm (Scatterplot) mit Regressionsgeraden ( $y = -0,1988x + 3,3791$ ) und Korrelationskoeffizienten  $r = -0,3316$ .

### 4.1.6 Validierung der SOCS-1 Genexpressionsdaten

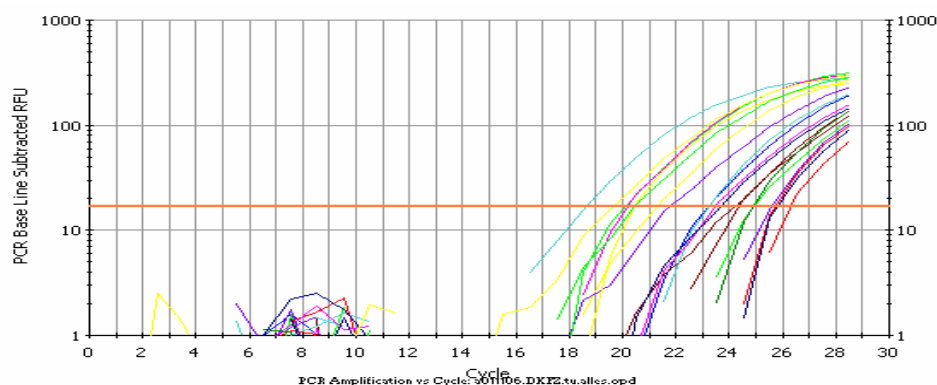
Dem SOCS Gen, einem Suppressor im Zytokin-Signaltransduktionsweg, wird eine wichtige Rolle in der Entwicklung des primären Leberzellkarzinoms zugeschrieben.

Zardo et al. konnten anhand einer Untersuchungsreihe an Tumoren des ZNS zeigen, dass SOCS durch Methylierung in fast allen Tumorproben inaktiviert war. Diese und auch andere Untersuchungen zeigen, dass SOCS eine wichtige Rolle im Zellwachstum hat und ein potentieller Tumor-Suppressor-Gen ist (Zardo et al., 2002; Yoshikawa et al., 2001).

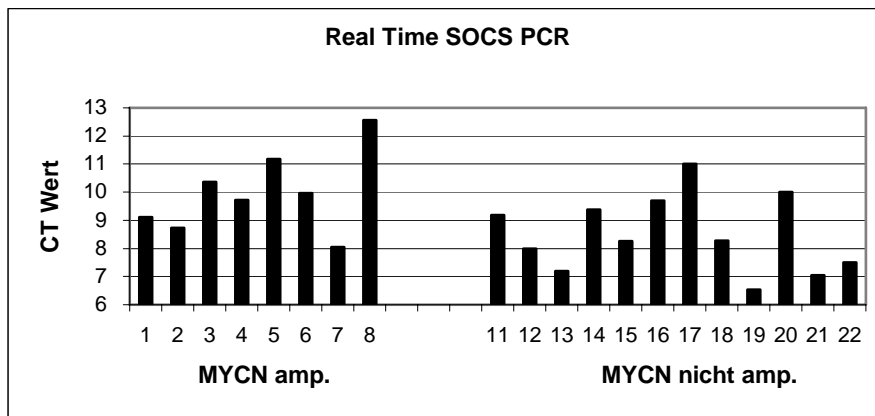
An zwei verschiedenen Tagen wurden zwei Versuche unter denselben Bedingungen durchgeführt, um das SOCS Expressionsprofil von 8 MYCN amplifizierten und 12 MYCN nicht amplifizierten Neuroblastomproben mittels quantitativer real-time PCR (SYBR Green) zu ermitteln (Fig.4.1.6). Die  $\beta$ -actin standardisierten Expressionsdaten wurden als

Säulendiagramm dargestellt (Fig.4.1.6). Ferner erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der erhaltenen PCR Produkte im Agarosegel (Fig.4.1.6). Mit Hilfe des Mann-Whitney U-Test konnte gezeigt werden, dass sich die  $\beta$ -actin standardisierten Werte, zwischen den beiden Gruppen (MYCN amplifiziert vs. MYCN nicht amplifiziert) signifikant unterscheiden ( $p=0,047$ ). Die MYCN amplifizierten Tumorproben haben größere  $C_t$  Werte als die MYCN nicht amplifizierten. Die SOCS Microarray-Genexpressionsmuster, erstellt aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten zwischen Standard-RNA und Tumor-RNA (Ratio), sind als Säulendiagramm dargestellt (Fig.4.1.6). Die real-time Ergebnisse korrelieren mit den Microarray-Ergebnissen, da wie aus Figur 5.1.6.D ersichtlich, im Microarray-Experiment in den MYCN amplifizierten Tumorproben das SOCS Gen auf einem niedrigeren Level als in den MYCN nicht amplifizierten Tumorproben exprimiert wird. Die Korrelation zwischen den Microarray- und real-time PCR Genexpressionsdaten wurde mit Hilfe eines Streudiagramms (Scatterplot) graphisch dargestellt (Fig.4.1.6). Die Stärke der Beziehung wurde mit einem Korrelationskoeffizienten quantifiziert ( $r = -0,61$ ). Der Scatterplot zeigt anschaulich, dass zwischen den Microarray- und real-time PCR SOCS Genexpressionsmuster nahezu ein bedeutender Zusammenhang besteht. Von einem deutlichen linearen Trend spricht man ab einem Korrelationskoeffizienten von  $< -0,7$  ( $>0,7$ ). Im vorliegenden Fall besteht eine negative lineare Beziehung zwischen den Variablen. Die Werte streuen nur wenig um die berechnete Regressionsgerade mit der Steigung  $a = -0,3597$  ( $y = ax + b$ ).

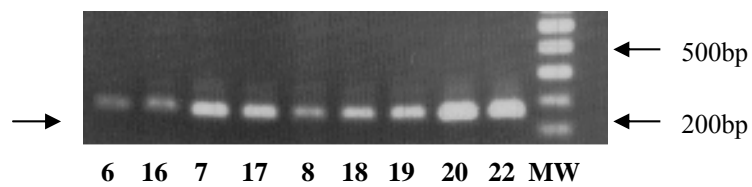
**A**



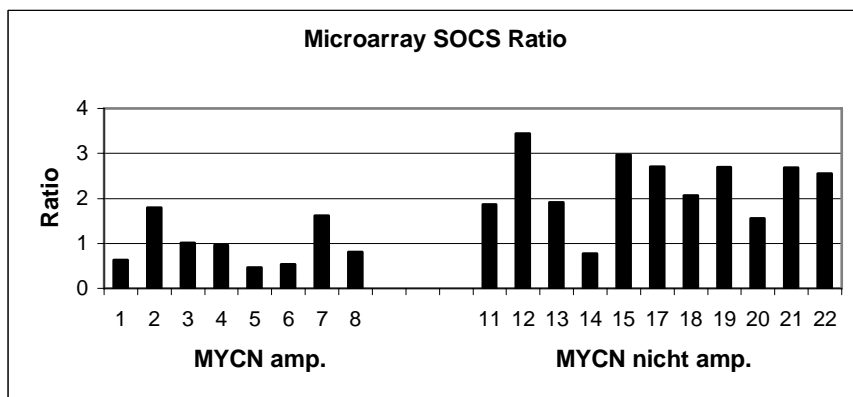
**B**



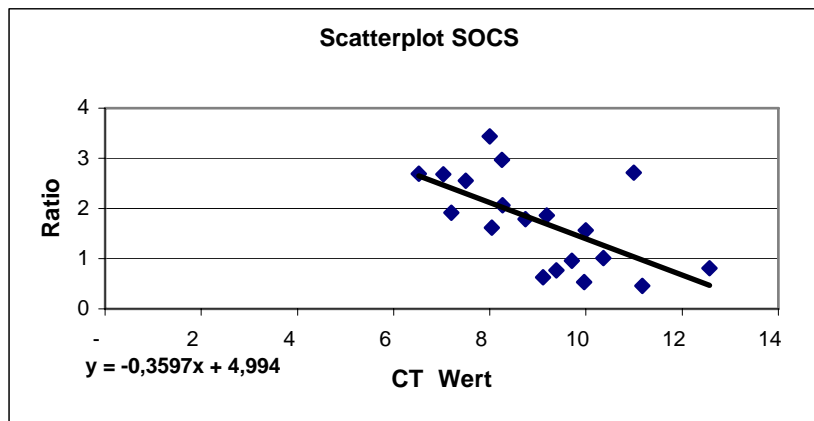
**C**



**D**



## E



Korrelationskoeffizient  $r = -0,61$

**Figur 4.1.6** Validierung der SOCS Genexpressionsdaten (zur ausführlichen Beschreibung siehe Figur 4.1.2).

(A) Repräsentative Darstellung der SOCS Amplifikationskurven. Auf der x-Achse sind die PCR Zyklen und auf der y-Achse das Fluoreszenzsignal logarithmisch aufgetragen. Die waagerechte Linie schneidet die Kurven im steilsten Bereich und bestimmt die  $C_t$ -Werte.

(B) Graphische Darstellung der  $\beta$ -actin standardisierten SOCS Genexpressionsdaten als Säulendiagramm. Auf der x-Achse sind die Tumorproben (1-8 MYCN amplifiziert, 11-21 MYCN nicht amplifiziert) auf der y-Achse der  $C_t$ -Wert aufgetragen. Die Unterschiede sind statistisch signifikant ( $p=0,047$ , Mann-Whitney U-Test).

(C) Agarosegelbild nach elektrophoretischer Auftrennung der SOCS PCR Produkte. Der Pfeil auf der linken Seite zeigt die Höhe des erwarteten PCR-Produktes an.

MW: Molekulargewichtsmarker. MYCN amplifizierte Proben (6-7-8), MYCN nicht amplifizierte Proben (16-17-18-19-20-22).

(D) Microarray SOCS Genexpressionsdaten als Säulendiagramm. Ratio: Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten zwischen Standard-RNA (SHEP) und Tumor-RNA.

(E) Streudiagramm (Scatterplot) mit Regressionsgeraden ( $y = -0,3597x + 4,994$ ) und Korrelationskoeffizienten  $r = -0,61$ .

Nach Abschluss der Validierungsergebnisse wurden differentiell exprimierte Gene in einem MYCN induzierbaren Zellkultursystem untersucht.

## 4.2 Analyse der differentiell exprimierten Gene in einem MYCN induzierbaren Zellkultursystem

In Abschnitt 4.1. konnte gezeigt werden, dass die Expression von ausgewählten Genen in Abhängigkeit von der MYCN Amplifikation unterschiedlich ist.

Daraus resultiert die Frage, ob ektope MYCN Expression diese Gene auch in einem Zellkultursystem reguliert.

Der Einfluss der MYCN Expression auf die Expression von induzierten Genen wie Aurora-A und TRAP1 wurde mittels der humanen Neuroblastomzelllinie SHEP Tet-21/N untersucht (Lutz et al., 1996). In dieser Zelllinie steht der MYCN Promoter unter dem supprimierenden

Einfluss von Tetrazyklin, dass heißt in Gegenwart von Tetrazyklin ist der MYCN Promoter inaktiv und MYCN wird nicht exprimiert. Wird diesem System Tetrazyklin entzogen, kommt es zur einer MYCN Induktion. Western-Blot Untersuchungen konnten zeigen, dass die MYCN-Induktion in dem tetrazyklinregulierten Zellkultursystem funktioniert.

Zu diesem Zweck wurde RNA in cDNA umgeschrieben und zu verschiedenen Zeitpunkten (keine MYCN Induktion und MYCN Induktion, d.h. langfristig ohne Tetrazyklin kultivierte Zellen) mittels quantitativer real-time PCR (SYBR Green) untersucht. Die transgene RNA wurde uns freundlicherweise aus der Arbeitsgruppe von Herrn Manfred Schwab, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, zur Verfügung gestellt. Zur Standardisierung der untersuchten Gene wurde  $\beta$ -actin cDNA verwendet.

An zwei verschiedenen Tagen wurden zwei Versuche unter denselben Bedingungen durchgeführt, um das Expressionsprofil der zu untersuchenden Gene in Abhängigkeit von der MYCN Induktion zu ermitteln. Die  $\beta$ -actin standardisierten Expressionsdaten wurden als Säulendiagramm dargestellt (Fig.4.2.).

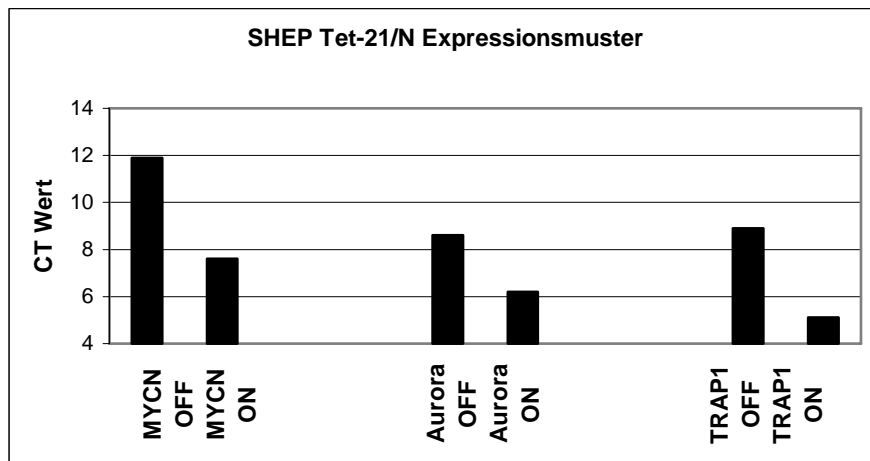
Die erhaltenen Daten zeigen anschaulich, dass die Expression von Aurora-A und TRAP1 von der MYCN Induktion abhängig ist. Ist die MYCN Induktion in Gegenwart von Tetrazyklin supprimiert, so ist auch die Expression von Aurora-A und TRAP1 vermindert.

Ferner wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die SOCS-1 Expression von der MYCN Induktion abhängig ist. In unserem Zellkulturexperiment konnte eine Genexpressionsregulation von SOCS-1 durch N-Myc nicht beobachtet werden.

**A**

| <b><math>\beta</math>-actin</b> | <b>1.Versuch</b> | <b>2.Versuch</b> | <b>MW</b> | <b>Delta</b> |
|---------------------------------|------------------|------------------|-----------|--------------|
| MYCN OFF                        | 16,5             | 15,8             | 16,1      |              |
| MYCN ON                         | 11,3             | 11               | 11,1      |              |
| <b>MYCN</b>                     |                  |                  |           |              |
| MYCN OFF                        | 28               | 28               | 28        | 11,9         |
| MYCN ON                         | 18,7             | 18,7             | 18,7      | 7,6          |
| <b>Aurora-A</b>                 |                  |                  |           |              |
| MYCN OFF                        | 24,6             | 24,9             | 24,8      | 8,6          |
| MYCN ON                         | 17,2             | 17,6             | 17,4      | 6,2          |
| <b>TRAP1</b>                    |                  |                  |           |              |
| MYCN OFF                        | 24,3             | 25,6             | 25        | 8,9          |
| MYCN ON                         | 16,2             | 16,4             | 16,3      | 5,1          |

## B



**Figur 4.2. Analyse der differentiell exprimierten Gene in einem MYCN induzierbaren System**

(A) Expressionstabelle: Nur Ergebnisse MYC OFF und MYC ON sind dargestellt

(B) Graphische Darstellung der SHEP Tet-21/N Expressionsmuster von MYCN, Aurora-A und TRAP1 als Säulendiagramm. Dabei bedeutet ON MYCN Promoter ist aktiv und Off MYCN Promoter ist inaktiv.

### 4.3 Untersuchungen von Aurora-A Amplifikationen mit dem Taqman

#### Verfahren

In der Literatur wird beschrieben, dass Aurora-A in zahlreichen Tumoren amplifiziert ist und eine hohe Expressionsrate aufweist. In Kolontumoren und 12 % aller primären Brusttumoren wird eine genomische Aurora-A Amplifikation beschrieben.

Ebenfalls konnte die genomische Amplifikation der Aurora-A spezifischen Region in der Neuroblastom-, Brust-, Kolon-, Ovarial-, und Prostata-Tumorzelllinie nachgewiesen werden (Zhou et al., 1998; Sen et al., 1997; Bischoff et al., 1998).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Aurora-A Amplifikation mit aggressiven Tumoren assoziiert ist. Aus diesem Grunde ist es interessant zu analysieren, ob in MYCN amplifizierten Tumoren ebenfalls eine Amplifikation der Aurora-A spezifischen Region vorliegt.

Zunächst wurde eine DNA-Verdünnungsreihe mit Einsatz von 200ng/400ng/800ng/1600ng/3200ng DNA für eine MYCN amplifizierte und eine MYCN nicht amplifizierte Tumorprobe durchgeführt, um die Genauigkeit der Messungen mit dem Taqman Verfahren zu überprüfen (Fig.4.3.A). Die Daten zeigen anschaulich, dass bei Verdopplung der DNA-Konzentration der  $C_t$  Wert um eine Einheit kleiner wird. Zur Standardisierung der untersuchten Tumorproben wurde WDR3 DNA als Referenzgen

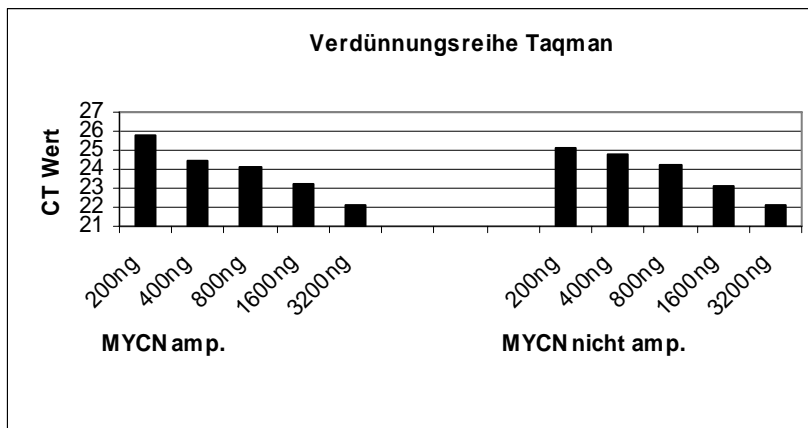
verwendet. WDR3 ist auf Chromosom 1 zentromernah lokalisiert und eine Amplifikation für dieses Gen ist in Neuroblastomen nicht beschrieben.

An zwei verschiedenen Tagen wurden zwei Versuche unter denselben Bedingungen durchgeführt, um das genomische WDR3 Amplifikationsprofil von 17 MYCN amplifizierten und 18 MYCN nicht amplifizierten Neuroblastomproben mit dem Taqman Verfahren zu ermitteln. Aus diesen Daten wurden die Mittelwerte berechnet. Anschließend wurden an zwei weiteren Tagen zwei Versuche unter denselben Bedingungen durchgeführt, um die genomische Amplifikation von Aurora-A an dem Microarray Patientenkollektiv (7 MYCN amplifizierten und 8 MYCN nicht amplifizierten Tumorproben) zu ermitteln. Die Versuchsreihe wurde mit 10 MYCN amplifizierten und 10 MYCN nicht amplifizierten Tumorproben erweitert. Die WDR3 standardisierten Amplifikationsprofile wurden als Säulendiagramm dargestellt (Fig.4.3). Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der Normalverteilung ausgewertet. Es wurde angenommen, dass die Differenz der Messwiederholungen normalverteilt ist. Die kritischen Grenzen für das 99 % Konfidenzintervall wurden ausgerechnet. Alle Messungen größer oder kleiner als diese Schranken wurden als signifikant angenommen. Nur Werte, die kleiner als die kritische Grenze sind sprechen für eine Amplifikation. Unter diesen Bedingungen, würde nur Tumorprobe-Nr.: 7 diese kritische Grenze überschreiten und wäre vierfach amplifiziert. In Anbetracht des zu erwartenden Fehlers von 0,35 und verschiedener Literaturquellen, kann davon ausgegangen werden, dass in dem von uns untersuchtem Patientenkollektiv eine höhergradige Amplifikation von Aurora-A nicht vorliegt (Raggi et al., 1999; Zhou et al., 1998).

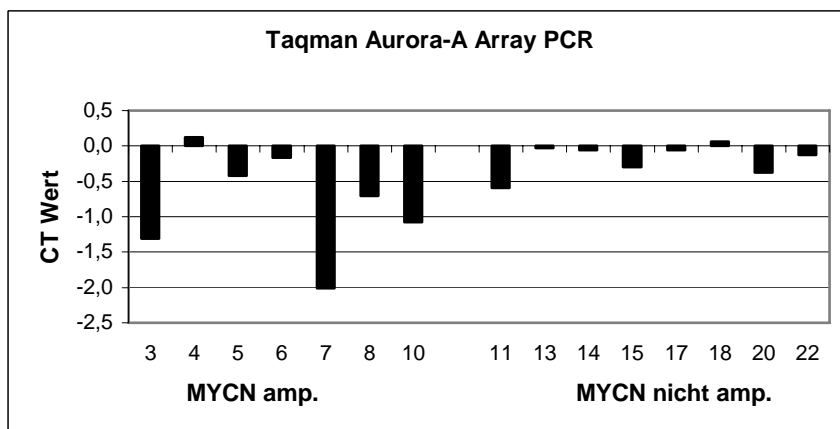
Im nächsten Schritt wurde die Amplifikation von Aurora-A an Neuroblastomzelllinien (IMR-5/LAN5/SY5Y/Kelly) untersucht. Bis auf SY5Y sind alle anderen Zelllinien MYCN amplifiziert. Nach Berechnung der Mittelwerte, wurde auch hier das WDR3 Gen zur Standardisierung der Daten herangezogen (Fig.4.3). Die in der Literatur beschriebene Beobachtung der genomischen Amplifikation von Aurora-A in der Neuroblastomzelllinie HTB10, um das 2,5 bis 5fache konnte an den von uns untersuchten Zelllinien nicht nachvollzogen werden (Zhou et al., 1998).



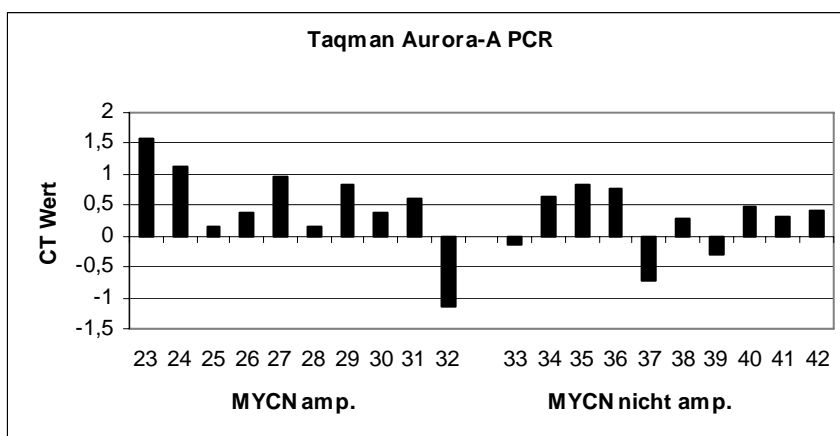
A



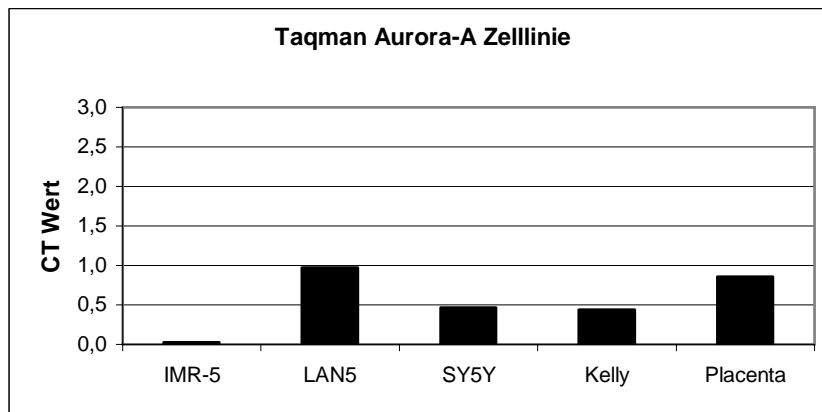
B



C



**D**



**Figur 4.3.** Untersuchungen von Aurora-A Amplifikationen mit dem Taqman Verfahren

(A) Taqman Verdünnungsreihe als Säulendiagramm. Auf der x-Achse sind die DNA-Konzentrationen und auf der y-Achse der  $C_t$ -Wert aufgetragen.

(B/C) Graphische Darstellung der WDR3 standardisierten Aurora-A Amplifikationsdaten als Säulendiagramm. Auf der x-Achse sind die Tumorproben (3-10/23-32 MYCN amplifiziert, 11-22/33-42 MYCN nicht amplifiziert) und auf der y-Achse der  $C_t$ -Wert aufgetragen.

(D) Aurora-A Taqman Zelllinienamplifikationsprofile als Säulendiagramm. Auf der x-Achse sind die Zelllinien und auf der y-Achse der  $C_t$ -Wert aufgetragen.

## Diskussion

Das Neuroblastom ist der häufigste extrakranielle Tumor bei Kindern unter 5 Jahren und unter anderem durch seine klinische und biologische Heterogenität gekennzeichnet (Young et al., 1986). Sowohl die Prognose als auch die klinische Therapie sind von mehreren klinischen und histopathologischen Faktoren abhängig (Breslow et al., 1971; Evans et al., 1971).

Neben den klinischen Faktoren, wie z.B. Alter und Tumorstadium haben sich molekulargenetische Marker etabliert.

Einer davon ist die genomische Amplifikation des MYCN-Protoonkogens. Brodeur et al. konnten zeigen, dass die MYCN Amplifikation mit fortgeschrittenen Tumorstadien, schneller Tumorprogression und einer insgesamt schlechten Prognose vergesellschaftet ist (Brodeur et al., 1984; Seeger et al., 1985). Daher ist es naheliegend nach Genen zu suchen, die durch N-Myc reguliert werden. Die Identifizierung solcher Gene soll zum Verständnis der biologischen Effekte von MYCN und deren Mechanismen beitragen. Mit Hilfe der Microarray-Technologie wurden Kandidatengene durch Veränderungen im Genexpressionsmuster von MYCN amplifizierten und MYCN nicht amplifizierten Tumorproben erfasst. Dieses führte zu einer Liste von Genen, die durch N-Myc reguliert sind.

Die Microarray-Technologie ermöglicht die Analyse der Genexpressionsmuster von tausenden von Genen in einem einzelnen Experiment (Skena et al., 1995; Skena et al., 1996; Lockhart et al., 1996). Diese Technik ist in der Anwendung mit Einschränkungen verbunden. Es gibt viele unterschiedliche Technologien/Methoden, was dazu führt, dass die Ergebnisse methodisch verschiedener Experimente nicht direkt vergleichbar sind.

Mills et al. beschreiben, dass signifikante Unterschiede in Microarray-Ergebnissen aus verschiedenen Experimenten, besonders für Gene mit niedrigem Expressionsmuster bestehen. Um diese Variabilität einzugrenzen, sind Versuchswiederholungen unumgänglich (Mills et al., 2001). Aufgrund der hohen Kosten und der komplexen Datenauswertung kann diese Forderung nur bedingt umgesetzt werden.

Experimente mit Microarrays enthalten zahlreiche potentielle Fehlerquellen, wie heterogene RNA-Qualität von Primärtumoren, cDNA-Bibliotheken mit falschen Genen (Sequenzen können aus Bibliotheken stammen, die bis zu 5 % fehlerhafte Anotationen haben), Artefakte

als Fehlerquelle, Querhybridisierung zwischen ähnlichen Sequenzen und fehlerhafte Messungen der Intensitäten (Koizumi, 2004).

Darum ist es nicht möglich ohne weiteres aus einer einzigen Microarray-Genexpressionsanalyse Schlussfolgerungen zu ziehen. Dies macht die Validierung der Microarray-Expressionsdaten an ausgewählten Genen anhand alternativer Methoden, wie z.B. der quantitativen real-time PCR notwendig (Bustin, 2000).

Weitere Methoden zur Validierung sind beispielsweise Northern-Blot Analysen, die In Situ Hybridisierung (Parker und Barnes, 1999) und der RNase Protektion Assay (Hod, 1992; Saccomanno et al., 1992).

In dieser Arbeit wurden Microarray-Ergebnisse mittels real-time PCR validiert. Um diese Methoden mit anderen Validierungsmöglichkeiten vergleichen zu können sind im Folgenden die einzelnen Methoden mit Vor- und Nachteilen dargestellt.

### **5.1 Northern-Blot**

Eine der bekanntesten und am häufigsten verwendeten Methoden zur Analyse von differentieller Genexpression ist der Northern-Blot. Ein Nachteil dieser Methode besteht in der hohen Arbeitsintensität. Ferner ist der Northern-Blot für die mRNA Quantifizierung in niedriger Konzentration kein ausreichend sensitives Verfahren.

### **5.2 Ribonuklease Protektion Assay**

Der Ribonuklease protektion assay (RPA) dient der Identifikation und Quantifizierung von RNA (meist mRNA) in einem Gemisch aus zellulärer Gesamt-RNA. Diese Methode ist eines der genauesten Verfahren zur mRNA Quantifizierung, doch zumindest gegenwärtig ist es eine verhältnismäßig aufwendige Technik. Für den RPA wird eine markierte RNA-Sonde synthetisiert, die zur Ziel-RNA komplementär ist. Verglichen mit dem Northern-Blot ist diese Methode um ein vielfaches Sensitiver und lässt auch die mRNA Detektion niedrigerer Konzentration zu (Sambrook et al., 1989). Die Eigenschaften der RNA-Sonde determinieren die Spezifität und Sensitivität dieser Methode.

Gegenwärtig konnten keine Arbeiten gefunden werden, die mit der RPA, Microarray-Genexpressionsdaten analysieren.

### **5.3 In Situ Hybridisierung (ISH)**

Mit Hilfe der In Situ Hybridisierung besteht die Möglichkeit, DNA oder RNA, in der Zelle am histologischen Schnittpräparat nachzuweisen. Durch ISH lassen sich Informationen über die lokale Verteilung der RNA ermitteln. Dieses Verfahren hat im Gegensatz zu den anderen Expressionsanalysetechniken den Vorteil, dass eine positive Reaktion in Bezug zur Morphologie gesetzt werden kann (Wilcox et al., 1993). Die ISH gebraucht einsträngige Nukleinsäuren, die vorher mit einer Markierung versehen wurden, als Sonde. Ferner können mRNA schwacher Konzentration nur mit radioaktiver Markierung nachgewiesen werden (Wilcox et al., 1993).

Ein Hauptproblem dieser Methode stellt die hohe Arbeitsintensität dar. Ferner ist die ISH von den hier beschriebenen Methoden am wenigsten zur (absoluten) Quantifizierung von mRNA geeignet (Wright et al., 1995; Burbach et al., 1987).

### **5.4 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qrt-PCR)**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine in vitro-Technik. Die zyklische Wiederholung von Reaktionsschritten erlaubt eine annähernd exponentielle Amplifikation der Zielsequenz (Rappolee et al., 1988). Gerade die exponentielle Amplifikation begründet die hohe Sensitivität und Geschwindigkeit der PCR. Die PCR erlaubt die Amplifikation von mRNA, jedoch muss sie zuvor durch reverse Transkriptase in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben werden. Im Vergleich zu den anderen Quantifizierungstechniken ist dieses Verfahren sehr sensitiv und ermöglicht die Detektion von mRNA auch in kleinsten Mengen (Reue, 1998; Wang und Brown, 1999).

Es ist in der Lage Expressionsmuster verschiedener Proben miteinander zu vergleichen bzw. RNA Eigenschaften zu analysieren. Jedoch ist eine Auswertung mittels Agarosegelelektrophorese notwendig, die immer noch sehr Zeit- und Arbeitsintensiv ist. Aus diesem Grunde wurde die PCR zur quantitativen real-time PCR weiterentwickelt.

Die real-time PCR ermöglicht die DNA/cDNA-Amplifikation und Detektion des Produktes in einem einzigen Reaktionsgefäß. Noch während der Amplifizierung erfolgt der direkte Nachweis der PCR-Produkte (Wall und Edwards, 2002). Das Kontaminationsrisiko wird im Vergleich zur konventionellen PCR stark minimiert. Die entstehenden Amplifikate werden bei dieser Technologie durch interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe, wie SYBR Green angefärbt und erfasst (Higuchi et al., 1993). Eine zweite Möglichkeit stellt die Anwendung einer mit Farbstoffen gekoppelten Sonde (Taqman Sonde) dar, die mit den während der PCR

entstehenden Amplifikaten hybridisiert (Lee et al., 2003). Verschiedene Arbeiten untermauern die Annahme, dass die Taqman real-time PCR sensitiver als die konventionelle PCR ist (Smith et al., 2001). Balic-Maganja et al. zeigten in ihrer Arbeit, dass die Taqman PCR eine 100 fache höhere Sensitivität aufweist, als die konventionelle PCR (Balic-Maganja und Grom, 2001). Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass der Variationskoeffizient von  $C_t$ -Werten für die Taqman Technik mit weniger als 2 % (Heid et al., 1996; Gerard et al., 1998) signifikant besser ist als für die konventionelle PCR mit 14 % (Zhang et al., 1997). Fronhoffs et al. konnten diese Beobachtungen bestätigen und zeigten, dass die real-time PCR generell reproduzierbarere Ergebnisse als die konventionelle PCR liefert (Fronhoffs et al., 2002).

Die Amplifikation verliert zum Ende der PCR-Reaktion an Linearität. Mit zunehmender Anzahl der Zyklen wird die Zielsequenz nicht mehr amplifiziert, die Reaktion erreicht eine Plateau-Phase (Kainz, 2000).

Es ist darauf zu achten, dass die Auswertung nicht in der Plateau-Phase durchgeführt wird, da die Gefahr besteht, signifikante Unterschiede im Expressionsmuster zwischen verschiedenen Proben nicht sicher erfassen zu können (Reue, 1998).

#### **5.4.1 Probleme der Real-Time PCR**

Die hohe Sensitivität und der exponentielle Charakter der PCR stellen eine Fehlerquelle für falsch-positive Ergebnisse durch DNA-Kontaminationen dar (Heinrich et al., 1991; Kwok et al., 1989). Dieses Problem kann durch Primer, die mindestens ein Intron der genomischen Sequenz überspannen, kontrolliert werden. Damit besteht die Möglichkeit zwischen spezifischem und unspezifischem Produkt anhand der verschiedenen Größen zu differenzieren (Reue, 1998). Auch in Gegenwart der zu amplifizierten Zielsequenz kann es zu falsch-negativen Ergebnissen kommen. Ursachen können zum einen Inhibition der Polymerase durch diverse Substanzen im Reaktionsansatz oder zum anderen fehlerhafte Anlagerung des Primers an die Zielsequenz und fehlende Elongation durch die Polymerase sein (Wilson, 1997).

Bei der Verwendung von interkalierenden Farbstoffen, wie SYBR Green ist eine Differenzierung zwischen spezifischem Produkt und Artefakt nicht möglich, da auch Primer-Dimere und Nebenprodukte, die sich während der Reaktion bilden, zu einem Fluoreszenzanstieg führen (Bustin, 2000; Vandesompele et al., 2002).

Mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse kann man diesen Umstand beheben. Am Ende der Reaktion kann somit zwischen spezifischem Produkt und Artefakt unterschieden werden (Ririe et al., 1997). Ferner determiniert die Amplifikatlänge die Stärke des Fluoreszenzsignals. Eine konstante Amplifikationseffizienz angenommen, generiert die Amplifikation einer größeren Matrize im Gegensatz zu der einer kleineren Zielsequenz, ein stärkeres Fluoreszenzsignal (Bustin, 2000).

#### **5.4.2. Standardisierung der quantitativen Real-Time PCR**

Die zytoplasmatische  $\beta$ -actin RNA ist sehr gut untersucht und kann in allen humanen Geweben zur Standardisierung herangezogen werden. In der Literatur wird beschrieben, dass  $\beta$ -actin nur minimale intraindividuelle Unterschiede im Expressionsmuster zeigt und primär nicht unter dem Einfluss pathologischer Prozesse steht (Kreutzer et al., 1999).

In dieser Arbeit wurden Expressionsmuster zwischen MYCN amplifizierten und MYCN nicht amplifizierten Tumorproben mittels  $\beta$ -actin standardisiert (Kap.4.1.1).

Die mRNA/cDNA für die endogene Kontrolle (hier  $\beta$ -actin) und die Zielsequenz wurden aus derselben Tumorprobe gewonnen. Anschließend erfolgte die Amplifikation von Zielsequenz und Standardsequenz in einer separaten PCR-Reaktion. Dieses Vorgehen ermöglicht in der exponentiellen Phase eine voneinander unabhängige Auswertung der  $C_t$ -Werte, denn es ist nicht auszuschließen, dass die Standardsequenz bereits die Plateauphase erreicht hat, während die Zielsequenz noch nicht einmal darstellbar ist (Murphy et al., 1990).

Unter unseren experimentellen Bedingungen erfüllt  $\beta$ -actin die Kriterien, die an ein Referenzgen gestellt werden. Die statistische Auswertung der  $C_t$ -Werte zeigt, dass die Abweichungen zwischen den Subgruppen nicht signifikant ist. Dies lässt jedoch nicht den Schluss zu, dass  $\beta$ -actin auch unter anderen experimentellen Bedingungen als Referenzgen eingesetzt werden kann. Deswegen sollte vorab immer überprüft werden, ob das ausgewählte Referenzgen für das jeweilige Experiment geeignet ist.

Die Auswahl des geeigneten Referenzgens ist unabdingbare Voraussetzung für eine akkurate Genexpressionsanalyse.

### **5.4.3 Einsatz der Real-Time PCR zur Validierung der Microarray-Genexpressionsdaten**

Die Validierung von Microarray-Genexpressionsdaten erfordert ein Verfahren mit hoher Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit. Diese Anforderungen werden durch die quantitative real-time PCR erfüllt (Bustin, 2002; Ginzinger, 2002). Grundsätzlich weist die real-time PCR gegenüber den anderen mRNA Quantifizierungsverfahren wie Northern-Blot, RPA und In Situ Hybridisierung Vorteile bezüglich der Geschwindigkeit, der einfachen Durchführbarkeit, der Automatisierbarkeit, des hohen Probendurchsatzes und der Nachweisgrenze auf.

Ferner lassen sich fast alle biologischen Materialien als Ausgangsmaterial nutzen, wobei nur kleinste Mengen benötigt werden (Radonic et al., 2004; Martell et al., 1999).

Die real-time PCR ist somit die Methode der Wahl, um mit höchster Sensitivität bei vertretbarem Arbeitsaufwand eine genaue Quantifizierung von RNA-Molekülen durchzuführen (Wong et al., 2005).

Die Validierung von Microarray-Genexpressionsdaten mit etablierten mRNA-Quantifizierungstechniken ist ein notwendiges und anerkanntes Verfahren (Chuaqui et al., 2002).

Die Zahl der Arbeiten, die Microarray-Genexpressionsdaten mit der real-time PCR analysieren, steigt stetig an (Rajeevan et al., 2001; Lerosey et al., 2004).

Chaib et al. untersuchten mit Hilfe des Microarray-Verfahrens die Expressionsprofile von 588 Genen an normalem und maligne entartetem Prostata-Gewebe. Zur Validierung der gefundenen differentiell exprimierten Gene kamen die real-time PCR und der Northern- Blot zur Anwendung.

In dieser Arbeit konnten 14 von 15 untersuchten Genen mittels real-time PCR und 8 von 8 untersuchten Genen mittels Northern-Blot validiert werden (Chaib et al., 2001).

In einer anderen Arbeit analysierten Coller et al. die Microarray-Genexpressionsdaten an 6 ausgewählten Genen mittels Northern-Blot Verfahren. Alle untersuchten Gene wurden als reguliert bestätigt (Coller et al., 1999).

Jenson et al. analysierten ebenfalls mit dem Micorarray-Verfahren die Expressionsprofile von circa 4500 Genen an Zelllinien. Die differentiell exprimierten Gene wurden mit der real-time PCR validiert und es konnte eine Übereinstimmung der Expressionsergebnisse anhand der untersuchten Gene in 75 % zwischen beiden Methoden beobachtet werden. Weitere

Literaturquellen zeigen ähnliche Ergebnisse, wie z.B. die Publikation von Rajeevan et al. In dieser Arbeit wurden Microarray-Genexpressiosdaten an 24 ausgewählten Genen mit der SYBR Green real-time PCR analysiert. In 71 % der Fälle (17 von 24) wurden die gefundenen



Gene als reguliert verifiziert. Ferner konnten Mutch et al. eine Übereinstimmung der Expressionsergebnisse beider Methoden in 86 % der untersuchten Gene feststellen (Mutch et al., 2002).

## **5.5. Eigene Ergebnisse**

### **5.5.1 Validierung der Microarray-Genexpressionsdaten mittels SYBR Green PCR**

Mit der Entdeckung von N-Myc als Transkriptionsfaktor wurden Untersuchungen durchgeführt, um durch N-Myc regulierte Gene zu erfassen. Die Identifizierung solcher Gene und deren Funktion sollten zum Verständnis der biologischen Effekte von N-Myc und deren Mechanismen beitragen. Mittels Microarray-Technologie wurden MYCN amplifizierte mit MYCN nicht amplifizierten Tumorproben verglichen, um weitere Zielgene von N-Myc zu erfassen.

Die Microarray-Technologie bietet unbestritten zahlreiche Vorteile in der Anwendung.

Aufgrund der potentiellen Fehlerquellen dieses Verfahrens ist es notwendig, Microarray-Ergebnisse anhand alternativer etablierter Verfahren, wie der quantitativen real-time PCR zu validieren (Rajeevan et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden differentiell exprimierte Microarray-Genexpressionsdaten von 5 ausgewählten Genen (MYCN/Aurora-A/SOCS-1/TRAP1/EFNB3) an 10 MYCN amplifizierten und 12 MYCN nicht amplifizierten Tumorproben unter Verwendung der quantitativen real-time PCR untersucht.

Gene aus den Microarray-Experimenten mit einem p-Wert unter 5 % wurden hierbei als differentiell exprimiert angesehen.

Zuerst erfolgte die MYCN-Genexpressionsanalyse als Positiv-Kontrolle bei bekannter MYCN Amplifikation.

Publizierte Daten zeigen, dass die MYCN Amplifikation in der Mehrzahl der Fälle mit hoher MYCN Expression vergesellschaftet ist (Bordow et al., 1998). Diese Beobachtungen konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Die MYCN Expression erfolgte in den MYCN amplifizierten Neuroblastomen auf einem höheren Niveau als in den MYCN nicht amplifizierten Neuroblastomen (Kap. 4.1.2).

Die Mehrzahl der Gene, die in MYCN amplifizierten Tumoren hochreguliert sind kodieren für Transkripte, die funktionell in die Proteinsynthese und die Zellzyklusregulation involviert

sind. Diese Beobachtungen konnten in Microarray-Experimenten, in denen induzierbare Zellkultursysteme verwendet wurden bestätigt werden (Coller et al., 2000; Guo et al., 2000; Menssen und Hermeking, 2002; O'Hagan et al., 2000; Schumacher et al., 2001).

Eines der in MYCN amplifizierten Tumoren hochregulierten Zellzyklusgene ist Aurora-A. Dieses Regulationsgen kodiert funktionell für Transkripte, die in den G2/M Kontrollpunkt eingreifen und zeigen, dass MYCN eine wesentliche Rolle in der späteren Zellzyklusphase hat (Berwanger et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Aurora-A in MYCN amplifizierten Neuroblastomen hochreguliert wird (Kap. 4.1.3).

Aurora-A kodiert für eine Zentrosomen-assoziierte Kinase, die mitotische Vorgänge, wie Zentrosomenverdopplung, -Reifung und -Ausrichtung reguliert. Die Amplifikation und Überexpression der Aurora-A spezifischen Region konnte in Neuroblastomen und auch in weiteren Tumorarten nachgewiesen werden (Zhou et al., 1998; Ewart-Toland et al., 2003).

In 12-50 % der Ovarial-, Brust-, Kolorektal- und Magentumoren konnte eine Amplifikation der chromosomalen Region 20q13.2 nachgewiesen werden, in der das Aurora-A Gen lokalisiert ist (Tanner et al., 2000; Gritsko et al., 2003). In Medulloblastomen ist die Amplifikation und Überexpression von Aurora-A als ein unabhängiger molekulargenetischer Marker anzusehen und geht insgesamt mit einer schlechten Prognose einher (Neben et al., 2004).

Aurora-A wird eine wichtige Rolle in der Transformation von Säugetierzellen zugeschrieben. Seine Überexpression führt zu Zentrosomenamplifikation, abnormaler Regulation während der Zellteilung (G2/M Kontrollpunkt) und zur Chromosomeninstabilität (Zhou et al., 1998; Krasnoselsky et al., 2005).

Die ektope Überexpression von Aurora-A führt in der Mausezelllinie NIH 3T3 zur onkogenen Transformation in vitro. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Aurora-A Überexpression in humaner diploider Brustzelllinie ebenfalls zur genomischen Instabilität und Aneuploidie führt (Zhou et al., 1998).

Mehrere Publikationen konnten zeigen, dass spezifische Aurora-A Inhibitoren, das Tumorstadium in Tumorzelllinien hemmen und zur Apoptoseeinleitung führen (Rojanala et al., 2004; Harrington et al., 2004).

Die Regulation von Aurora-A selbst erfolgt nicht direkt über N-Myc, sondern über einen bisher ungeklärten Mechanismus. Es konnte keine Myc Bindung an E-Boxen nachgewiesen werden (Berwanger et al., 2002).

Aus den genannten Publikationen geht hervor, dass Aurora-A neben der G2/M-Zellzykluskontrolle eine wichtige Rolle in der Karzinogenese hat und hier ein möglicher Therapieansatz in der Behandlung von Tumorerkrankungen liegen kann.

Im Gegensatz zu Aurora-A ist TRAP1 ein direktes durch N-Myc hochreguliertes Zielgen, wie Coller et al. in einem MYCN induzierbaren Zellkultursystem zeigen konnten (Coller et al., 2000).

TRAP1 besitzt Myc spezifische Sequenzen (E-Boxen). Über diese E-Boxen kann N-Myc als Transkriptionsfaktor, die Transkription von TRAP1 direkt regulieren (Berwanger et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass TRAP1 in MYCN amplifizierten Neuroblastomen hochreguliert wird (Kap.4.1.4).

TRAP1 ist ein mitochondriales Protein, das zur Familie der Hitze Schock Proteine gehört und mit dem Tumornekrosefaktorrezeptor 1 (TNFR-1) und dem Retinoblastom-Protein (Rb) in Wechselwirkung tritt (Felts et al., 2000). TRAP1 bindet an das Retinoblastom-Protein während der Mitose und nach Hitze einwirkung. Das Retinoblastom-Protein ist verantwortlich für die Zellzyklusprogression und zelluläre Differenzierung (Chen et al., 1996).

Der TNFR-1 ist in die Abwehr von Mikroorganismen und Krankheitserreger involviert und vermittelt Zytotoxizität (Song et al., 1995).

Die Expression von TRAP1 erfolgt in zahlreichen transformierten Zelllinien auf einem hohen Niveau. Masuda et al. konnten in der Bronchialkarzinom- und Leukämiezelllinie durch spezifische Inhibitoren, wie  $\beta$ -HIVS ( $\beta$ -Hydroxyisovalerylshikonin) und VP16, die Expression von TRAP1 supprimieren, was wiederum zur Apoptoseinduktion führte. Ferner wurde unter diesen Versuchsbedingungen ein Anstieg von apoptotischen Faktoren im Mitochondrium, wie Cytochrom C beobachtet (Masuda et al., 2004).

Diese Daten könnten einen Hinweis darauf sein, dass die Überexpression von TRAP1 mit einem antiapoptotischen Effekt einhergeht.

Zahlreiche Gene, die in MYCN amplifizierten Tumoren herunterreguliert sind, kodieren für Proteine, die eine wesentliche Rolle in Signaltransduktionswegen spielen, wie SOCS-1 (Suppressor of cytokine signaling 1).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in MYCN amplifizierten Neuroblastomen die Expression von SOCS-1 herunterreguliert ist (Kap.4.1.6).

SOCS-1 hemmt die Zytokin vermittelte Signaltransduktion von der Zelloberfläche in den Zellkern, indem es den JAK/STAT-Signalweg (Janus kinase signal transducers and activators of transcription), der seinerseits wiederum Zellwachstum fördert, hemmt. Der durch JAK/STAT vermittelte Signaltransduktionskomplex bindet im Zellkern an spezifische DNA-Abschnitte und wirkt als Transkriptionsfaktor.

Publizierte Daten zeigen, dass die Expression von SOCS-1, durch Hypermethylierung in Leberzellkarzinomen, Pankreaskarzinomen und in Multiplen Myelomen inaktiviert wird (Komazaki et al., 2004; Yoshikawa et al., 2001; Galm et al., 2003). Durch Inaktivierung von SOCS-1 kommt es zur Dysregulation im JAK/STAT Signalweg, was wesentlich zur Tumorentstehung beiträgt.

Es ist wichtig zu untersuchen, ob dieser Mechanismus der SOCS-1 Inaktivierung in MYCN amplifizierten Neuroblastomen vorhanden ist. Es könnte ein weiterer Therapieansatz sein, die SOCS-1 Expression in Neuroblastomen durch demethylierende Substanzen zu steigern, und so den durch die Janus-Kinase vermittelten Signaltransduktionsweg zu unterdrücken.

Im Microarray-Experiment konnte in MYCN amplifizierten Neuroblastomen ein weiteres herunterreguliertes Gen, das EFNB3 gefunden werden, welches in die Signaltransduktion involviert ist (Kap.4.1.5).

Ephrinrezeptoren und deren Liganden, wie EFNB3 spielen eine herausragende Rolle in der neuralen und kardiovaskulären Entwicklung. Die Überexpression von EFNB3 ist mit günstigen Tumorstadien (1, 2 und 4S) und hoher TrkA Koexpression korreliert (Tang et al., 2000). Die Expression von TrkA ist ein prognostisch günstiger molekulargenetischer Marker in Neuroblastomen (Tang et al., 1999). Ferner wird EFNB3 in MYCN amplifizierten Neuroblastomen auf einem niedrigeren Level als in MYCN nicht amplifizierten Neuroblastomen exprimiert. Der molekulargenetische Marker EFNB3 hat in Neuroblastomen neben der MYCN Amplifikation, dem Alter und dem Stadium zum Zeitpunkt der Diagnosestellung einen prognostischen Aussagewert (Tang et al., 2000). Neuroblastompatienten mit hoch exprimiertem EFNB3 haben bessere 5 Jahres-Überlebensraten, als Neuroblastompatienten mit niedrig exprimiertem EFNB3.

Es konnte gezeigt werden, dass Neuroblastome mit niedrig exprimiertem EFNB3 eine schlechte Prognose unabhängig vom Grad der MYCN Amplifikation haben (Tang et al., 2000). Diese Daten zeigen anschaulich, welchen prognostischen Stellenwert die Expression von Ephrinrezeptoren und deren Liganden, wie EFNB3 für die Überlebensrate in Neuroblastomen hat.

Weitere Arbeiten sind notwendig, um Funktion, Signaltransduktion und Regulation dieser prognostisch günstigen Gene besser zu verstehen und um neue Therapieansätze für Neuroblastome mit ungünstigem Krankheitsverlauf zu generieren.

Durch statistische Analysen mit Hilfe des Mann-Whitney U-Test konnte für alle Gene bis auf EFNB3 ein signifikanter Unterschied im Expressionsmuster zwischen MYCN amplifizierten und MYCN nicht amplifizierten Tumorproben ermittelt werden. Mittels Korrelationskoeffizienten  $r$  und Determinationskoeffizienten  $r^2$  wurden die Microarray- und real-time Expressionsdaten in Beziehung gesetzt.

Für EFNB3 bestand nur ein sehr schwacher Zusammenhang zwischen diesen beiden Variablen, während für die anderen Gene ein bedeutender Zusammenhang ermittelt werden konnte.

Auch Rajeevan et al. untersuchten Microarray-Genexpressionsdaten an 24 ausgewählten Genen mittels der quantitativen real-time PCR. Expressionsunterschiede konnten in 17 von 24 untersuchten Genen verifiziert werden (Rajeevan et al., 2001). Ferner konnten Rajeevan et al. zeigen, dass die real-time PCR als schnelles, robustes, spezifisches und sensitives Verfahren geeignet ist, um Microarray-Expressionsdaten zu analysieren.

Faßt man die vorliegenden Ergebnisse zusammen, so konnten Unterschiede im Microarray-Expressionsmuster in 4 von 5 untersuchten Genen mittels real-time PCR bestätigt werden.

Diese Ergebnisse sind ähnlich den Untersuchungen von Rajeevan et al. und damit hinweisend dafür, dass die Microarray-Technologie als Screening Verfahren eingesetzt werden kann (Rajeevan et al., 2001). Jedoch müssen Gene von besonderem Interesse, die durch statistische Verfahren ermittelt werden, durch ausreichend sensitive und spezifische Expressionsanalysetechniken, wie der quantitativen real-time PCR bestätigt werden.

Ein weiteres unabhängiges Validierungsverfahren ist die Analyse der differentiell exprimierten Gene in einem MYCN induzierbaren System.

### **5.5.2 Analyse der differentiell exprimierten Gene in einem MYCN induzierbaren System**

Lutz et al. untersuchten mit Hilfe der induzierbaren humanen Neuroblastomzelllinie SHEP Tet-21/N den Einfluss, den die Expression von MYCN auf die Expression von potentiellen Zielgenen hat.

Sie konnten zeigen, dass die Expressionsrate von Alpha-Prothymosin und Ornithin-Decarboxylase direkt durch Myc reguliert wird (Lutz et al., 1996). Auch Boon et al. nahmen diese Neuroblastomzelllinie zur Hilfe, um weitere durch Myc direkt regulierte Zielgene zu erfassen (Boon et al., 2001).

Ein weiterer Validierungsansatz, um die biologischen Effekte von N-Myc besser zu verstehen, war den Einfluss der MYCN Expression auf die Expression von hochregulierten Genen, wie Aurora-A und TRAP1 mittels der transgenen humanen Neuroblastomzelllinie SHEP Tet-21/N zu untersuchen. In diesem Zellkultursystem steht der MYCN Promoter unter dem supprimierenden Einfluss von Tetrazyklin (Fulda et al., 2000).

In Kapitel 4.1 dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Aurora-A und TRAP1 in MYCN amplifizierten Tumorproben stärker exprimiert werden, als in MYCN nicht amplifizierten Proben.

Die Ergebnisse aus den in diesem Zusammenhang durchgeführten Experimenten bestätigen die Resultate aus Kapitel 4.1 und zeigen anschaulich, daß die Expression von Aurora-A und TRAP1 von der MYCN Induktion abhängig sind. Bereits Coller et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass TRAP1 als direktes Myc Zielgen in einem MYCN induzierbaren Zellkultursystem hochreguliert wird (Coller et al., 2000).

Die Regulation von SOCS-1, das in MYCN amplifizierten Neuroblastomen herunterreguliert ist, konnte in dem von uns verwendeten induzierbaren Zellkultursystem nicht beobachtet werden.

Ein Erklärungsversuch könnte sein, dass Regulationsmechanismen die in Neuroblastomen vorhanden sind in Zellkultursystemen nicht simuliert werden können.

Gegenwärtig existieren keine Arbeiten, die genaue N-Myc Regulationsmechanismen von Aurora-A beschreiben. Publierte Daten zeigen, dass Aurora-A keine N-Myc spezifischen Sequenzen aufweist (E-Boxen) und damit indirekt über Effektorproteine durch N-Myc reguliert werden könnte (Berwanger et al., 2002).

Diese Daten bestätigen, dass N-Myc als Transkriptionsfaktor eine Vielzahl von Genen reguliert (Grandori et al., 2000), wenngleich der Mechanismus der Expression für eine Reihe von Genen nicht abschließend geklärt ist und die Frage offen bleibt, ob N-Myc diese Gene direkt oder über andere Effektorproteine indirekt reguliert.

Um diese Fragen zu beantworten sind weitere Experimente erforderlich.

### **5.5.3 Untersuchungen von Aurora-A Amplifikationen mit dem Taqman Verfahren**

Raggi et al. zeigten in ihrer Arbeit, dass das Taqman Verfahren verglichen mit den konventionellen Methoden, wie Hybridisierungstechniken oder der kompetitiven PCR, die zur Analyse von genomischer Amplifikation verwendet werden, wesentliche Vorteile bezüglich der Geschwindigkeit, der einfachen Durchführbarkeit, der Sensitivität und der Spezifität bietet (Raggi et al., 1999). Auch die Menge der zu untersuchenden Proben ist beim Taqman Verfahren wesentlich geringer als bei konventionellen Methoden.

Eine wesentliche Einschränkung der Taqman Technik ist, dass eine Amplifikationsänderung um das zwei bis vierfache, was einem  $C_t$ -Wert Unterschied von 1 bis 2 entspricht, nicht sicher erfasst werden kann. Erfahrungsgemäß beruhen bei der Taqman Methode  $C_t$ -Wert Differenzen bis zu  $\pm 1.0$ , wie sie z.B. bei Aurora-A und WDR3 auftraten, auf methodisch bedingten Schwankungen.

Peccoud und Jakob bestätigen diese Beobachtungen und konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass real-time PCR Ergebnisse für Proben mit kleiner Kopienzahl nur eingeschränkt reproduzierbar sind (Peccoud und Jakob, 1996).

Zhou et al. untersuchten mehrere unterschiedliche Tumorzelllinien mittels Southern-Blot und Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung auf genomische Amplifikation von Aurora-A (Zhou et al., 1998). Sie konnten zeigen, dass in der Neuroblastomzelllinie HTB10, Aurora-A um das 2,5-5 fache amplifiziert ist.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, eines der regulierten Gene, Aurora-A, auf genomische Amplifikation mittels Taqman Verfahren zu analysieren. Zu diesem Zweck wurden 17 MYCN amplifizierte und 18 MYCN nicht amplifizierte Neuroblastomproben mit dem Taqman Verfahren untersucht.

Nach statistischer Auswertung mittels Normalverteilung war höchstens eine Probe um das vierfache amplifiziert.

Raggi et al. untersuchten die genomische Amplifikation von MYCN in Neuroblastomproben mit dem Taqman Verfahren (Raggi et al., 1999). Zur Standardisierung der erhaltenen MCYN Daten wurden  $\beta$ -actin als Referenzgen verwendet. Dabei wurden nur Tumorproben mit einem Verhältnis MYCN zu  $\beta$ -actin über 2 als amplifiziert angesehen.

In Anbetracht des zu erwartenden Fehlers (0,35) und den methodisch bedingten Schwankungen in den  $C_t$ -Werten, kann davon ausgegangen werden, dass in dem von uns untersuchten Patientenkollektiv keine höhergradige Aurora-A Amplifikation vorlag.

Im nächsten Schritt wurde die Amplifikation von Aurora-A anhand der Neuroblastomzelllinien (IMR-5/LAN5/SY5Y/Kelly) untersucht. Es ist bekannt, dass bis auf SY5Y alle anderen Zelllinien MYCN amplifiziert sind.

Eine Amplifikation der Aurora-A spezifischen Region konnte auch in diesen Experimenten nicht beobachtet werden.

Fasst man die vorliegenden Ergebnisse zusammen, so konnte in unseren Experimenten keine höhergradige Aurora-A Amplifikation detektiert werden. Jedoch können Amplifikationsunterschiede um das zwei bis vierfache hierbei nicht sicher ausgeschlossen werden.

Kleinere Amplifikationsunterschiede können mit alternativen Methoden, wie der Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH) sensitiv nachgewiesen werden. Shapiro et al. konnten zeigen, dass die FISH zur genomischen Amplifikationsanalyse als zuverlässiges Verfahren eingesetzt werden kann, auch wenn die zu untersuchende Tumormenge gering ist (Shapiro et al., 1993). Ergebnisse aus mehreren Untersuchungen verdeutlichen, dass mit Hilfe der FISH DNA-Veränderungen, wie z. B. Amplifikationen, in Abhängigkeit von der verwendeten Sonde sehr sensitiv dargestellt werden können (Jenkins et al., 1997; Shapiro et al., 1993).



### **Zusammenfassung**

Das Neuroblastom ist der häufigste extrakranielle Tumor bei Kindern unter 5 Jahren und unter anderem durch seine klinische und biologische Heterogenität gekennzeichnet. Sowohl die Prognose als auch die Therapie sind von mehreren klinischen und histopathologischen Faktoren abhängig. Ein wichtiger prognostischer Parameter ist die genomische Amplifikation des MYCN-Protoonkogens. Zahlreiche Untersuchungen konnten zeigen, dass die MYCN Amplifikation mit fortgeschrittenen Tumorstadien, schneller Tumorprogression und einer insgesamt schlechten Prognose vergesellschaftet ist.

Es wurden Microarray-Experimente durchgeführt, um Gene, die durch N-Myc reguliert werden zu erfassen. Die Identifizierung solcher Gene und deren Funktion sollen zum Verständnis der biologischen Effekte von N-Myc und deren Mechanismen beitragen.

Wie aus verschiedenen Publikationen hervorgeht, weist die Microarray-Technologie unbestrittene Vorteile in der praktischen Anwendung auf.

Aufgrund der potentiellen Fehlerquellen dieses Verfahrens ist es notwendig, Microarray-Ergebnisse anhand alternativer etablierter Verfahren zu validieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Microarray-Genexpressionsdaten von fünf ausgewählten Genen an MYCN amplifizierten und MYCN nicht amplifizierten Tumorproben mittels der quantitativen real-time PCR untersucht.

Dabei konnten Expressionsmusterunterschiede in vier von fünf untersuchten Genen bestätigt werden.

In der Literatur werden ähnliche Ergebnisse beschrieben, womit die Untersuchungen hinweisend dafür sind, dass die Microarray-Technologie als Screening Verfahren eingesetzt werden kann.

Es ist jedoch von großer Wichtigkeit, die durch statistische Verfahren ermittelten Kandidatengene durch ausreichend sensitive und spezifische Expressionsanalysetechniken, wie der quantitativen real-time PCR zu verifizieren.

Ein weiterer Validierungsansatz in der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss der MYCN Expression auf die Expression von hochregulierten Genen wie Aurora-A und TRAP1 mittels der Neuroblastomzelllinie SHEP Tet-21/N, in welcher der MYCN Promoter unter dem supprimierenden Einfluss von Tetrazyklin steht, zu untersuchen.

Die Ergebnisse zeigen analog den in der Literatur vorbeschriebenen Beobachtungen anschaulich, dass die Expression der untersuchten Gene von der MYCN Induktion abhängig ist.

Ferner widmet sich diese Arbeit der Fragestellung, ob in MYCN amplifizierten Tumorproben eine Amplifikation der Aurora-A spezifischen Region detektiert werden kann.

Hierzu wurden MYCN amplifizierte und MYCN nicht amplifizierte Neuroblastomproben sowie Neuroblastomzelllinien mit dem Taqman Verfahren untersucht.

Fasst man die vorliegenden Ergebnisse zusammen, so konnte in unseren Experimenten keine höhergradige Aurora-A Amplifikation detektiert werden. Jedoch können Amplifikationsunterschiede um das zwei bis vierfache hierbei nicht sicher ausgeschlossen werden.

### Literaturverzeichnis

Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977; 74:5350-5354.

Askew DS, Ashmun RA, Simmons BC, Cleveland JL. Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene*. 1991; 6(10):1915-1922.

Bao J, Zervos AS. Isolation and characterization of Nmi, a novel partner of Myc proteins. *Oncogene*. 1996; 12(10):2171-2176.

Barlic-Manganja D, Grom J. Highly sensitive one-tube RT-PCR and microplate hybridisation assay for the detection and for the discrimination of clinical swine fever virus from other pestiviruses. *J Virol Methods*. 2001; 95:101-110.

Berger SL, Wallace DM, Puskas RS, Eschenfeldt VH. Reverse transcriptase and its associated ribonuclease H: Interplay of two enzymes activity controls the yield of single-stranded complementary deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*. 1983; 22:2365-2372.

Berk AJ, Sharp PA. Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids. *Cell*. 1977; 12:721-732.

Berthold F. Neuroblastomstudie NB 97(1998). Studienprotokoll. Köln

Berthold F, Hero B. Neuroblastoma-Current Drug Therapy Recommendations as part of the Total Treatment Approach. *Drugs*. 2000; 59:1261-1277.

Berwanger B, Hartmann O, Bergmann E, Bernard S, Nielsen D, Krause M, Kartal A, Flynn D, Wiedemeyer R, Schwab M, Schafer H, Christiansen H, Eilers M. Loss of a FYN-regulated differentiation and growth arrest pathway in advanced stage neuroblastoma. *Cancer Cell*. 2002; 2:377-386.

Biedler JL, Ross RA, Shanske S, Sprengler BA. Human neuroblastoma cytogenetics: search for significance of homogeneously staining regions and double minute chromosomes. *Prog Cancer Res Ther*. 1980; 12:81.

Bischoff RJ, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, Schryver B, Flanagan P, Clairvoyant F, Ginther C, Chan CS, Novotny M, Slamon DJ, Plowman GD. A homologue of *Drosophila aurora* kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J*. 1998; 17:3052-3065.

Blackwell TK, Kretzner L, Blackwood EM, Eisenman RN, Weintraub H. Sequence-specific DNA-binding of c-Myc protein. *Science*. 1990; 250:1149-1151.

Blyth K, Stewart M, Bell M, James C, Evan G, Neil JC, Cameron ER. Sensitivity to myc-induced apoptosis is retained in spontaneous and transplanted lymphomas of CD2-mycER mice. *Oncogene*. 2000; 19:773-782.

Bordow SB, Norris MD, Haber PS, Marshall GM, Haber M. Prognostic significance of MYCN oncogene expression in childhood neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 1998; 16: 3286-3294.

Boon K, Caron NH, Asperen R, Valentijn L, Hermus MC, Sluis P, Roobeek I, Weis I, Voute PA, Schwab M, Versteeg, R. N-myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis. *Embo J*. 2001; 6:1383-1393.

Bown N, Cotterill S, Lastowska M, O'Neill S, Pearson AD, Plantaz D, Meddeb M, Danglot G, Brinkschmidt C, Christiansen H, Laureys G, Speleman F. Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med*. 1999; 340(25):1954-1961.

Breslow N, McCann B. Statistical estimation of prognosis for children with neuroblastoma. *Cancer Res.* 1971; 31:2098-2103.

Brodeur GM, Fong CT. Molecular biology and genetics of human neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 1989; 41:153-174.

Brodeur GM, Seeger RC. Gene amplification in human neuroblastomas: basic mechanisms and clinical implications. *Cancer Genet Cytogenet.* 1986; 19(1-2):101-111.

Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science.* 1984; 224:1121-1124.

Brodeur GM, Sekhon GS, Goldstein MN. Chromosomal aberrations in human neuroblastomas. *Cancer.* 1977; 40:2256-2263.

Burbach JPH, Voorhuis TAM, Van Tol HHM, Ivell R. In situ hybridization of oxytocin messenger RNA: macroscopic distribution and quantitation in rat hypothalamic cell groups. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987; 145:10-14.

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000; 25:169-193.

Caron H, Peter M, van Sluis P. Evidence for two tumor suppressor loci on chromosomal bands 1p35-36 involved in neuroblastoma: one probably imprinted, another associated with N-myc amplification. *Hum Mol Genet.* 1995; 4:535-539.

Chaib H, Cockrell EK, Rubin MA, Macoska JA. Profiling and verification of gene expression patterns in normal and malignant human prostate cancer by cDNA microarray analysis. *Neoplasia.* 2001; 3:43-52.

Chen FC, Chen Y, Dai K, Chen PL, Riley DJ, Lee WH. A new member of the hsp90 Family of Molecular chaperones interacts with the retinoblastoma protein during mitosis and after heat shock. *Mol Cell Biol.* 1996; 16(9):4691-4699.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987; 162:156-159.

Christiansen H, Sahin K, Berthold F, Hero B, Terpe HJ and Lampert F.

Comparison of DNA Aneuploidy, Chromosome 1 Abnormalities, MYCN Amplification and CD44 Expression as Prognostic Factors in Neuroblastoma. *Eur J Cancer.* 1995; 31:541-544.

Chuaqui RF, Bonner RF, Best CJ, Gillespie JW, Flaig MJ, Hewitt SM, Phillips JL, Krizman DB, Tangrea MA, Ahram M, Linehan WM, Knezevic V, Ermmert-Buck MR. Post analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nat Genet.* 2002; 32:509-514.

Coller HA, Grandori C, Tamayo P, Colbert T, Lander ES, Eisenman RN, Golub TR. Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97(7):3260-3265.

Combaret V, Lasset C, Bouvier R, Frappaz D, Thiesse P, Rebillard A C, Philip T, Favrot MC. CD44 expression: a new prognostic factor in neuroblastoma. *Bull Caner.* 1995; 82(2):131-136.

Couturier J, Sastre-Garau X, Schneider-Maunory S, Labib A, Orth G. Integration of papillomavirus DNA near myc genes in genital carcinoma and its consequence for protooncogene expression. *J Virol.* 1991; 65:4534-4538.

Davis AC, Wilms M, Spotts GD, Hann SR, Bradley A.

A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes Dev.* 1993; 7(4):671-682.

Elliot K, Sakamuro D, Basu A, Du W, Wunner W, Staller P, Gaubatz S, Zhang H, Prochownik E, Eilers M, Prendergast GC. Bin1 funktionally interacts with Myc and inhibits cell proliferation via multiple mechanisms. *Oncogene.* 1999; 18(24):3564-3573.

El Shafie M, Samuel D, Klippel CH, Robinson MG, Cullen BJ. Intractable diarrhea in children with VIP-secreting ganglioneuroblastomas. *J Pediatr Surg.* 1983; 18:34-36.

Ewart-Toland A, Briassouli P, de Koning JP, Mao JH, Yuan J, Chan F, MacCarthy-Morrogh L, Ponder BA, Nagase H, Burn J, Ball S, Almeida M, Linardopoulus S, Balmain A. Nat Genet. 2003; 34:403-412.

Evans AE, D'Angio GJ, Randolph JA. A proposed staging for children with neuroblastoma: Children's Cancer Study Group A. Cancer. 1971; 27:374.

Evans A. Advances in Neuroblastoma Research. Natural history of Neuroblastoma, 3-12. Raven Press, New York. 1980.

Eilers M, Picard D, Yamamoto KR, Bishop JM. Chimaeras of myc oncoprotein and steroid receptors cause hormone-dependent transformation of cells. Nature. 1989 ; 340(6228):66-68.

Felts SJ, Owen BAL, Nguyen PM, Trepel J, Donner DB, Toft DO. The hsp90-related Protein TRAP1 is a Mitochondrial Protein with distinct functional Properties. Journal of Biological Chemistry. 2000; 5:3305-3312.

Ferre F, Marchese A, Pezzoli P, Griffin S, Buxton E, Boyer V. Quantitative PCR-An overview. Polymerase Chain Reaction. Birkhauser Boston, Cambridge, MA. 1984:67-88.

Foley KP, Leonard MW, Engel J.D. Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction. Trends Genet. 1993; 9:380-385.

Fong CT, White PS, Peterson K. Loss of heterozygosity for chromosomes 1 and 14 defines subsets of advanced neuroblastomas. Cancer Res. 1992; 52:1780-1785.

Fourel G, Treppe C, Bougueleret L. Frequent activation of N-myc genes by hepadnavirus insertion in woodchuck liver tumors. Nature. 1990; 347:294-298.

Fronhoffs S, Totzke G, Stier S, Wernert N, Rothe M, Bruning T, Koch B, Sachinidis A, Vetter H, Ko Y. A method for the rapid construction of cRNA standard curves in quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. Mol Cell Probes. 2000; 16:99-110.

Fulda S, Lutz W, Schwab M, Debatin KM. MycN Sensitizes Neuroblastoma Cells for Drug-Triggered Apoptosis, *Medical and Pediatric Oncology*. 2000; 35:582-584.

Galderisi U, Di Bernardo G, Cipollaro M, Jori FP, Piegari E, Cascino A, Peluso G, Melone MA. Induction of apoptosis and differentiation in neuroblastoma and astrocytoma cells by the overexpression of Bin 1, a novel MYC interacting protein. *J Cell Biochem*. 1999; 74(3):313-322.

Galm O, Yoshikawa H. SOCS-1, a negative regulator of cytokine signaling, is frequently silenced by methylation in multiple myelom. *Blood*. 2003; 101(7):2784-2788.

Gerard CJ, Olsson K, Ramanathan R, Reading C, Hanania EG. Improved quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using real-time polymerase chain reaction and plasmid-DNA complementarity determining region III standards. *Cancer Research*. 1998; 58:3957-3964.

Giannini G, Cerignoli F, Mellone M, Massimi I, Ambrosi C, Rinaldi C, Dominici C, Frati L, Screpanti I, Gulino A. High mobility group A1 is a molecular target for MYCN in human neuroblastoma. *Cancer Res*. 2005; 65(18):8308-8316.

Gilbert F, Balaban G, Moorhead P, Bianchi D, Schlesinger H. Abnormalities of chromosome 1p in human neuroblastoma tumors and cell lines. *Cancer Genet Cytogenet*. 1982; 7:33-42.

Gilbert F, Feder M, Balaban G, Brangman D, Lurie DK, Podolsky R, Rinaldt V, Vinikoor N, Weisband J. Human neuroblastomas and abnormalities of chromosomes 1 and 17. *Cancer Res*. 1984; 44(11):5444-5449.

Ginzinger DG. Gene quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol*. 2002; 29:23-39.

Grandori C, Cowley SM, James LP, Eisenman RN. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behaviour. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2000; 16:653-699.



Gregory MA, Xiao Q, Cornwall GA, Lutterbach B, Hann SR. B-Myc is preferentially expressed in hormonally-controlled tissues and inhibits cellular proliferation. *Oncogene*. 2000; 19(42):4886-4895.

Greenberg RA, O'Hagan RC, Deng H, Xiao Q, Hann SR, Adams RR, Lichtsteiner S, Chin L, Morin GB, DePinho RA. Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of c-Myc but is not functionally equivalent in cellular transformation. *Oncogene*. 1999; 18(5):1219-1226.

Gritsko TM, Coppola D, Paciga JE, Yang L, Sun M, Shelley SA, Fiorica JV, Nicosia SV, Cheng JQ. Activation and overexpression of centrosome kinase BTAK/Aurora-A in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2003; 9:1420-1426.

Guo C, White PS, Hogarty MD, Brodeur GM, Gerbing R, Stram DO, Maris JM. Deletion of 11q23 is a frequent event in the evolution of MYCN single-copy high-risk neuroblastomas. *Med Pediatr Oncol*. 2000; 35(6):544-546.

Harrington EA, Bebbington D, Moore J, Rasmussen RK, Ajose-Adeogun AO, Nakayama T, Graham JA, Demur C, Hercend T, Diu-Hercend A, Su M, Golec JM, Miller KM. VX-680, a potent and selective small molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. *Nat Med*. 2004; Mar, 10(3):262-267.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ & Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Research*. 1996; 6:986-994.

Heinrich M. PCR carry over. *BFE*. 1991; 8:594-597.

Henriksson M, Lüscher B. Proteins of the Myc network:essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res*. 1996; 68:109-182.

Herold S, Wanzel M, Beuger V, Frohme C, Beul D, Hillukkala T, Syvaoja J, Saluz HP, Haenel F, Eilers M. Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. *Mol Cell*. 2002; 10(3):509-521.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*. 1993; 11:1026-1030.

Hod Y. A simplified ribonuclease protection assay. *Biotechniques*. 1992; 163:852-854.

Janoueix-Lerosey I, Novikov E, Monteiro M, Gruel N, Schleiermacher G, Loriod B, Nguyen C, Delattre O. Gene expression profiling of 1p35-36 genes in neuroblastoma. *Oncogene*. 2004; 23(25):1-11.

Jenkins RB, Qian J, Lieber MM, Bostwick DG. Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res*. 1997; 57:524-531.

Jenson SD, Robetroye RS, Bohling SD, Schumacher JA, Morgen JW, Lim MS, Elenitoba-Johnson KSJ. Validation of cDNA microarray gene expression data obtained from linearly amplified RNA. *Mol Pathol*. 2003; 56(6):307-312.

Joshi VV, Cantor AB, Altshuler G, Larkin EW, Neil JS, Shuster JJ, Holbrock CT, Hayes FA, Nitschke R, Duncan MH, et al. Age-linked prognostic categorization based on a new histologic grading system of neuroblastoma. A clinicopathologic study of 211 cases from the Pediatric Oncology Group. *Cancer*. 1992; 69(8):2197-2211.

Kaatsch P, Kaletsch U, Spix C. Annual report 1998, German Childhood Cancer registry, Mainz. 1999 :72-88.

Kainz P. The PCR plateau phase-towards an understanding of its limitations. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1494:23-27.

Karn J, Watson JV, Lowe AD, Green SM, Verdeckis W. Regulation of cell cycle duration by c-myc levels. *Oncogene*. 1989; 4(6):773-787.

Kedar A, Glassman M, Voorhess ML. Severe hypertension in a child with ganglioneuroblastoma. *Cancer*. 1981; 47:2077-2080.

Khan J, Chen QR. High-resolution cDNA microarray-based comparative genomic hybridization analysis in neuroblastoma. *Cancer Lett.* 2005; 228(1-2):71-81.

Klein R, Nanduri V, Jing S. The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell.* 1991; 66:395-403.

Koizumi S. Application of DNA Microarrays in Occupational Health Research. *J Occup Health.* 2004; 46:20-25.

Komazaki T, Nagai H, Emi M, Terada Y, Yabe A, Jin E, Kawanami O, Konishi N, Moryama Y, Naka T, Kishimoto T. Hypermethylation-associated Inactivation of the SOCS-1 Gene, a JAK/STAT Inhibitor, in Human Pancreatic Cancers. *Journal of Clinical Oncol.* 2004; 34(4):191-194.

Krams M, Hero B, Berthold F. Full-length telomerase reverse transcriptase messenger RNA is an independent prognostic factor in neuroblastoma. *Am J Pathol.* 2003; 162:1019-1026.

Krasnoselsky AL, Whiteford CC, We JS, Bilke S, Westermann F, Chen QR, Khan J. Altered expression of cell cycle gene distinguishes aggressive neuroblastoma. *Oncogene.* 2005; 24(9):1533-1541.

Kreutzer KA, Lass U, Landt O, Nitsche A, Laser J, Ellerbrok H, Pauli G, Huhn D, Schmidt CA. Highly sensitive and specific fluorescence reverse transcription-PCR assay for the pseudogene-free detection of beta-actin transcripts as quantitative reference. *Clinical Chemistry.* 1999; 45:297-300.

Kwok S. Procedures to minimize PCR-product carryover. *Amplifications.* 1989; 2:4.

Lee J, Duncan A, Warrik S. Techniques for Optimizing: RT-PCR Reactions. *Pharma Genomics.* 2003; 1:50-55.

Lemaitre JM, Buckle RS, Mechali M. c-Myc in the control of cell proliferation an embryonic development. *Adv Cancer Res.* 1996; 70:95-144.

Liew KJ, Chow VT. Microarray and real-time RT-PCR analyses of a novel set of differentially expressed human genes in ECV304 endothelial-like cells infected with dengue virus type 2. *J Virol Methods*. 2006; 131(1):47-57.

Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kabayashi M, Horton H, Brown EL. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnol*. 1996; 14:1675-1680.

Look AT, Hayes FA, Nitschke R, McWilliams NB, Green AA. Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma. *N Engl J Med*. 1984; 311:231-235.

Look AT, Hayes FA, Shuster JJ, Douglass EC, Castleberry RP, Brodeur GM. Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 1991; 9:581-591.

Lutz W, Stohr M, Schurmann J, Wenzel A, Lohr A, Schwab M. Conditional expression of N-myc in human neuroblastomas cells increases expression of alpha-prothymosin and ornithine decarboxylase and accelerates progression into S-phase early after mitogenic stimulation of quiescent cells. *Oncogene*. 1996; 13(4):803-812.

Marcu KB, Bossone SA. Myc function and regulation. *Ann Rev Biochem*. 1992; 61:809-860.

Maris JM, Mathay KK. Molecular Biology of Neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 1999; 17(7):2264-2279.

Masuda Y, Shima G, Aiuchi T, Horie M, Hori K, Nakajo S, Kajimoto S, Imazu TS, Nakaya K. Involvement of tumor necrosis factor receptor-associated Protein 1 (TRAP1) in apoptosis induced by  $\beta$ -Hydroxyisovalerylshikonin. *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279:42503-42515.

Martell M, Gomez J, Esteban JL, Sauleda S, Quer J, Cabot B, Esteban R, Guardia J. High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C virus RNA. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999; 37:327-332.

McMahon SB, Van Buskirk HA, Dugan KA, Copeland TD, Cole MD. The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell*. 1998; 94(3):363-374.

Menssen A, Hermeking H. Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: Identification and analysis of c-MYC target genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99:6274-6279.

Mills JC, Gordon JL. A new approach for filtering noise from high-density oligonucleotide microarray datasets. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29(15):E72-2.

Mukherjee B, Morgenbesser SD, DePinho R. Myc family oncoproteins function through a common pathway to transform normal cells in culture: cross-interference by Max and trans-acting dominant mutant. *Genes Dev*. 1992; 6:1480-1492.

Murphy LD, Herzog CE, Rudick JB, Fojo AT, Bates SE. Use of the polymerase chain reaction in the quantitation of *mdr-1* gene expression. *Biochemistry*. 1990; 29(45):10351-10356.

Mutch DM, Berger A, Mansourian R, Rytz A, Roberts MA. The limit fold change model: a practical approach for selecting differentially expressed genes from microarray data. *BMC Bioinformatics*. 2002; 3:17.

Nakagawara A, Arima M, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM. Inverse relationship between *trk* expression and N-myc amplification in human neuroblastomas. *Cancer Res*. 1992; 52:1364-1368.

Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Scavarda NJ, Azar CG, Cantor AB, Brodeur GM. Association between high levels of expression of the TRK gene and favourable outcome in human neuroblastoma. *N Engl J Med*. 1993; 328(12):847-854.

Nakagawara A, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol*. 1994; 14:759-767.

Nau MM, Brooks BJ, Battey J, Sausville E, Gazdar AF, Kirsch IR, McBride OW, Bertness V, Hollis GF, Minna JD. L-myc, a new myc-related gene amplified and expression in human small cell lung cancer. *Nature*. 1985; 318(6041):69-73.

Neben K, Korshunov A, Benner A, Wrobel G, Hahn M, Kokocinski F, Golnaov A, Joos S, Lichter P. Micorarray-Based Screeing for Molecular Markers in Medulloblastoma Revealed STK15 as Independent Predictor for Survival. *Cancer Resarch*. 2004; 64: 3103-3111.

Nisen PD, Waber PG, Rich MA. N-myc oncogene RNA expression in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst*. 1988; 80:1633-1637.

Nishi M, Miyake H, Takeda T, Hanai J, Fujita K, Ichimiya H, Tanaka T, Hiramata T, Ishikawa Y, Kudoh T, Azuma H, Takase A. The relationship between homovanillic/vanillylmandelic acid ratios and prognosis in neuroblastoma. *Oncol Rep*. 1998; 5(3):631-633.

O'Hagan, RC, Schreiber-Agus N, Chen K, David G, Engelman JA, Schwab R, Alland L, Thomson C, Ronning DR, Sacchettie JC. Gene target recognition among members of myc superfamily and implications for oncogenesis. *Nat Genet*. 2000; 24:113-119.

Okubo K, Hori N, Matoba R, Niiyama T, Fukushima A, Kojima Y, Matsubara K. Large-scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. *Nature Genet*. 1992; 2:173-179.

Pajic M, Norris MD, Cohn SL, Haber M. The role of the multidrug resistance-associated protein 1 gene in neuroblastoma biology and clinical outcome. *Cancer Lett*. 2005; 228(1-2):241-246.

Parker RM, Barnes NM. mRNA: detection by in situ and northern hybridization. *Methods in Molecular Biology*. 1999; 106:247-283.

Peccoud J, Jacob C. Theoretical uncertainty of measurements using quantitative polymerase chain reaction. *Biophysics Journal*. 1996; 71:101-108.

Peukert K, Staller P, Schneider A, Carmichael G, Hanel F, Eilers M.

An alternative pathway for gene regulation by Myc. *EMBO J.* 1997; 16:5672-5686.

Prendergast GC. Myc structure and function. In: *Oncogenes as transcriptional regulators.* Birkhauser Verlag – Boston. 1997:1-28

Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2004; 313:856-862.

Raggi CC, Baghoni ML, Tonini GP, Maggi M, Vono G, Pinzani P, Mazzocco K, De Bernardi B, Pazzagli M, Orlando C. Real-time quantitative PCR for the measurement of MYCN amplifikation in human neuroblastoma with the TaqMan detection system. *Clin Chem.* 1999, 45(11):1918-1924.

Rajeevan MS, Vernon SD, Taysavang N, Unger E R. Validation of Array-Based Gene Expresson Profiles by Real-Time (Kinetic) RT-PCR. *JMD.* 2001; 3:26-31.

Rajeevan MS, Ranamukhaarchchi DG, Vernon SD, Unger ER. Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods.* 2001; 25:443-451.

Ramirez RD, Morales CP, Herbert BS, Rohde JM, Passons C, Shay JW, Wright WE. Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev.* 2001; 15:398-403.

Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z. Wound macrophage express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science.* 1998; 241:708-712.

Resar LMS, Dolde C, Barret JF, Dang CV. 1993. B-myc inhibits neoplastic transformation and transcriptional activation by c-myc. *Mol Cell Biol.* 1993; 13:1130-1136.

Reue K. mRNA Quantitation Techniques: Considerations for experimental design and application. *J Nutr* 1998; 128(11):2038-2044.

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*. 1997; 245(2):154-160.

Rojanala S, Han H, Munoz RM, Brown W, Nagle R, Von Hoff DD, Bearss DJ. The mitotic serine threonine kinase, Aurora-2, is a potential target for drug development in human pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther*. 2004; 3(4):451-457.

Sacomanno CF, Bordonaro M, Chen JS, Nordstrom JL. A faster ribonuclease protection assay. *Biotechniques*. 1992; 13:846-850.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985; 230(4732):1350-1354.

Sakamuro D, Elliott KJ, Wechsler-Reya R, Prendergast GC. BIN1 is a novel MYC-interacting protein with features of a tumor suppressor. *Nat Genet*. 1996; 14(1):69-77.

Saleh A, Schieltz D, Ting N, McMahon SB, Litchfield DW, Yates JR, Lees-Miller SP, Cole MD, Brandl CJ. Tra1p is a component of the yeast Ada. Spt transcriptional regulatory complexes. *J Biol Chem*. 1998; 273(41):26559-26565.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 1989.

Schena M, Schalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 1995; 270:467-470.

Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, Davis RW. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93:10614-10619.



Schilling FH, Spix C, Berthold F, Erttmann R, Sander J, Treuner J, Michaelis J. Children may not benefit from neuroblastoma screening at 1 year of age. Updated results of the population based controlled trial in Germany. *Cancer Lett.* 2003; 197(1-2):19-28.

Schramm A, Schulte JH, Klein-Hitpass L, Havers W, Sievert H, Berwanger B, Christiansen H, Warnat P, Brors B, Eils J, Eils R, Egget A. Prediction of clinical outcome and biological characterization of neuroblastoma by expression profiling. *Oncogene.* 2005; 24(53):7902-7912.

Schuhmacher M, Kohlhuber F, Holzel M, Kaiser C, Burtscher H, Jarsch M, Bornkamm GW, Laux G, Polack A, Weidle UH, Eick D. The transcriptional program of human B cell line in response to Myc. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29:397-406.

Schwab M, Amler L. Amplification of cellular oncogenes: a predictor of clinical outcome in human cancer. *Genes Chrom Cancer.* 1990; 1:181-193.

Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Human N-myc gene contributes to neoplastic transformation of mammalian cells in culture. *Nature.* 1985; 316:160-162.

Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, Varmus HE, Bishop JM, Gilbert F, Brodeur G, Goldstein M, Trent J. Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature.* 1983; 305(5931):245-248.

Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, Hammond D. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med.* 1985; 313(18):1111-1116.

Seeger RC, Wada R, Brodeur GM. Expression of N-myc by neuroblastomas with one or multiple copies of the oncogene. *Prog Clin Biol Res.* 1988; 271:41-49.

Sellner LN, Coelnen RJ, Mackenzie JS. Reverse transcriptase inhibits Taq polymerase activity. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20:1487-1490.

Sen S, Zhou H, White RA. A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. *Oncogene*. 1997; 14:2195-2200.

Shapiro DN, Valentine MB, Rowe ST, Sinclair AE, Sublett JE, Roberts WM, Look AT. Detection of N-myc gene amplification by fluorescence in situ hybridization. Diagnostic utility for neuroblastoma. *Am J Pathol*. 1993; 142(5):1339-1346.

Shimada H, Chatten J, Newton WA Jr. Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors; definition of subtypes of Ganglioneuoblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst*. 1984; 73:405-416.

Shohet MJ, Hicks MJ, Plon SE, Burlingame SM, Stuart S, Chen Si-Yi, Brenner MK, Nuchtern JG. Minichromosome Maintenance Protein MCM7 is a direct target of the MYCN Transcription Factor in Neuroblastoma. *Can Resarch*. 2002; 62:1123-1128.

Shuster JJ, McWilliams NB, Castleberry R, Nitschke R, Smith EI, Altshuler G, Kun L, Brodeur G, Joski V, Vietti T. Serum lactate dehydrogenase in childhood neuroblastoma. *Am J Clin Oncol*. 1992; 15:295-303.

Slack A, Chen Z, Tonelli R, Pule M, Hunt L, Pession A, Shohet JM. The p53 regulatory gene MDM2 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102(3):731-736.

Slavc I, Ellenbogen R, Jung WH. Myc gene amplification and expression in primary human neuroblastoma. *Cancer Res*. 1990; 50:1459-1463.

Smith IL, Halpin K, Warrilow D, Smith GA. Development of a fluorogenic RT-PCR assay (TaqMan) for the detection of Hendra virus. *J Virol Methods*. 2001; 98:33-40.

Song HY, Dunbar JD, Zhang YX, Guo D, Donner DB. *J Biol Chem*. 1995; 270: 3574-3581.

Steiner P, Philip A, Lucas J, Godden-Kent D, Pagano M, Mittnacht S, Bartek J, Eilers M. Identification of a Myc-dependent step during the formation of active G1 cyclin-cdk-complexes. *EMBO J.* 1995; 14:4814-4826.

Stone J, de Lange T, Ramsay G, Jakobovits E, Bishop JM, Varmus H, Lee B. Definition of regions in human c-myc that are involved in transformation and nuclear localization. *Mol Cell Bio.* 1987; 7:1697-1709.

Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. Control selection for RNA quantitation, *Biotechniques.* 2000; 29:332-337.

Takahashi E, Hori T, O'Connell P, Leppert M, White R. Mapping of the MYC gene to band 8q24.12-q24.13 by R-banding and distal to fra (8)(q24.11), FRA8E, by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.* 1991; 57(2-3):109-111.

Takeda O, Homma C, Maseki N. There may be two tumor suppressor genes on chromosome arm 1p closely associated with biologically distinct subtypes of neuroblastoma. *Genes Chromosom Cancer.* 1994; 10:30-39.

Tang XX, Evans AE, Zhao H, Cnaan A, London W, Cohn SL, Brodeur G M, Ikegaki N. *Clin. Cancer Res.* 1999; 5:1491-1496.

Tang XX, Zhao H, Robinson ME, Cohen B, Cnaan A, London W, Cohn SL, Cheung NKV, Brodeur GM, Evans AE, Ikegaki N. Implications of EPHB6, EFNB2, and EFNB3 expressions in human neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97(20):10936-10941.

Tanner MM, Grenman S, Koul A, Johnsson O, Meltzer P, Pejovic T, Borg A, Isola JJ. Frequent amplification of chromosomal region 20q12-q13 in ovarian cancer. *Clin.Cancer Res.* 2000; 6:1833-1839.

Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science.* 1998; 281:1312-1316.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Pappe B, VanRoy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002; 3(7):1-11.

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science.* 1995; 270:484-487.

Wall SJ, Edwards DR. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR): a comparison of primerdropping, competitive, and real-time RT-PCRs. *Analytical Biochemistry.* 2002; 300:269-273.

Wang T, Brown MJ. mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with Rnase protection. *Analytical Biochemistry.* 1999; 269:198-201.

Wang AM., Doyle MV, Mark DF. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86:9717-9721.

Weith A, Martinsson T, Cziepluch C, Bruderlein S, Amler LC, Berthold F. Neuroblastoma consensus deletion maps to 1p36.1-2. *Genes Chromosom Cancer.* 1989; 1:159-166.

Wilcox JN. Fundamental principles of in situ hybridization. *J Histochem Cytochem.* 1993; 41:1725-1733.

Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol.* 1997; 63:3741-3751.

Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques.* 2005; 39:75-85.

Wright PS, Cross-Doersen D, Chmielewski PA, Bush TL, Bitonti AJ, Miller JA. Measurement of mRNA levels in tumor xenografts with quantitative autoradiography and in situ hybridization. *FASEB J.* 1995; 9:279-283.

Wu K, Grandori C, Amacker M, Simon-Vermont N, Polack A, Lingner J and Dalla-Favera R. Direct activation of TERT transcription by c-Myc. *Nat. Genet.* 1999; 21:220-224.

Wyllie AH. 1993. Apoptosis. *Br J Cancer.* 1993; 67:205-208.

Yoshikawa H, Masubara K. SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nature Genet.* 2001; 28(1):29-35.

Young JL, Ries LG, Silverberg E, Horm JW, Miller RW. Cancer incidence, survival and mortality for children under 15 years of age. *Cancer.* 1986; 58:598-602.

Zardo G, Tiirikainen MI, Hong C, Misra A, Feuerstein BG, Volik S, Collins CC, Lamborn KR, Bollen A, Pinkel D, Albertson DG, Costello JF. Integrated genomic and epigenomic analyses pinpoint biallelic gene inactivation in tumors. *Nat Genet.* 2002; 32(3):453-458.

Zeltzer PM, Marangos PJ, Evans AE, Schneider LS. Serum neuron-specific enolase in children with neuroblastoma. Relationship to stage and disease course. *Cancer cell.* 1987; 57:1230-1234.

Zhang J, Byrne CD. Differential priming of RNA templates during cDNA synthesis markedly competitive reverse-transcriptase PCR. *Biochemical Journal.* 1997; 337:231-241.

Zhou H, Kuang J, Zhong L, Kuo WL, Gray JW, Sahin A, Brinkley BR, Sen S. Tumor amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet.* 1998; 20(2):189-193.

### Internetquellen

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>

**Anhang****8.1 Abkürzungen**

Spezielle Abkürzungen für Fachtermini die nicht in der Liste enthalten sind, werden im Text erläutert.

|                |  |
|----------------|--|
| amp.           | amplifiziert                               |
| bHLH-LZ        | Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper             |
| bp             | Basenpaare                                 |
| cDNA           | copy DNA                                   |
| C <sub>t</sub> | Threshold Cycle                            |
| dATP           | 2`Deoxyadenosintriphosphat                 |
| dCTP           | 2`Deoxycytidintriphosphat                  |
| dGTP           | 2`Deoxyguanosintriphosphat                 |
| Diff.          | Differenz                                  |
| dmins          | double-minute bodies                       |
| DMSO           | Dimethylsulfoxid                           |
| DNA            | deoxyribonucleid acid                      |
| dTTP           | 2`Deoxytymidintriphosphat                  |
| EDTA           | Ethylendiamintetraacetat                   |
| Fig.           | Figur                                      |
| g              | gram                                       |
| GAPDH          | Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase    |
| HSR            | homogeneously staining regions             |
| hTERT          | human telomerase reverse transcriptase     |
| HVA            | Homovanillinsäure                          |
| INSS           | International-Neuroblastoma-Staging-System |
| Kap.           | Kapitel                                    |
| LDH            | Lactat-Dehydrogenase                       |

|        |   |
|--------|---|
| log    | Logarithmus                                   |
| LOH    | Loss of Heterozygosity                        |
| min.   | Minute  |
| MKI    | Mitose-Kariorrhesis-Index                     |
| mRNA   | messenger RNA                                 |
| MW     | Mittelwert, Molekulargewichtsmarker           |
| n      | nano  |
| NCBI   | National Center for Biotechnology Information |
| NSE    | neuronenspezifische Enolase                   |
| PBS    | phosphate buffered saline                     |
| PCR    | polymerase chain reaction                     |
| rRNA   | ribosomale RNA                                |
| RT     | Reverse Transkription                         |
| Stad.  | Stadium                                       |
| Tab.   | Tabelle                                       |
| U      | Umdrehung                                     |
| überl. | überlebend                                    |
| verst. | verstorben                                    |
| VMA    | Vanillinmandelsäure                           |
| vs.    | versus  |
| μ      | mikro   |

## **8.2 Akademische Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Vorklinischer Studienabschnitt:

Aumüller, Basler, Cetin, Daut, Eilers, Feuser, Fuhsdorfer, Gemsa, Geus, Hasilik, Kern, Koolmann, Lammel, Lang, Leppek, Löffler, Müller, Röhm, Seifert, Seitz, Steiniger, Sundermeyer, Weihe, Westermann

Klinischer Studienabschnitt:

Arnold, Barth, Baum, Bien, Christiansen, Czubayko, Fuhrmann, Görg, Gotzen, Griss, Happle, Hesse, Juncas, Klenk, Klose, Krieg, Maisch, Moll, Moosdorf, Neubauer, Oertel, Renz, Rothmund, Schäfer, Schulz, Seybert, Schmidt, Vohland, von Wichert, Wagner, Werner



### **8.3 Danksagung**

In erster Linie möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Holger Christiansen für die freundliche und kompetente Betreuung und Überlassung eines sehr interessanten Themas. Ich danke Herrn Dr. med. Bernd Berwanger für die intensive Betreuung, Unterstützung und für das menschliche Engagement. Herr Berwanger hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin bedanke ich mich bei sämtlichen Mitarbeitern des Neuroblastomlabors und der Arbeitsgruppe Eilers für das angenehme Arbeitsklima und für die gute Zusammenarbeit.

Ein Dank ganz anderer Art gebührt meinen lieben Eltern und meinen Schwestern, die mich während des gesamten Studiums und während der Erstellung dieser Arbeit unermüdlich unterstützt und ermutigt haben.